

**Mobilität von ESR-Spinsonden nach epikutaner Applikation
unter besonderer Berücksichtigung der Wechselwirkungen zwischen
Liposomen und Haut**

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

im Fach Pharmazie
eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Apotheker Klaus-Peter Moll

geboren am 22. August 1971 in Soest

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin
Prof. Dr. J. Mlynek

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Prof. Dr. M. W. Linscheid

Gutachter: 1. Prof. Dr. H.-H. Borchert

2. Prof. Dr. R. Stößer

Tag der mündlichen Prüfung: 27.02.2004

Danksagung:

Die vorliegende Arbeit entstand am Institut für Pharmazie der Humboldt-Universität zu Berlin unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. H.-H. Borchert, dem ich an dieser Stelle für die Möglichkeit zur Bearbeitung des Themas besonders danken möchte.

Mein weiterer Dank gilt Herrn Prof. Dr. R. Stößer vom Institut für Physikalische und Theoretische Chemie der Humboldt-Universität zu Berlin, der durch seine stete Diskussionsbereitschaft sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Außerdem gilt mein Dank Herrn Dr. W. Herrmann für seine Unterstützung bei den ESR-Messungen und deren rechnergestützten Auswertung.

Frau U. Muschick möchte ich für ihre umfassende Unterstützung und die familiäre Atmosphäre im Labor danken.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, die die finanziellen Rahmenbedingungen für den Abschluss dieser Arbeit geschaffen haben und den übrigen Mitgliedern meiner Familie sowie Antonius Knep für ihre allseitige Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. R. H. Müller und seinem Doktoranden und Mitarbeitern danke ich für die freundliche Aufnahme in ihrem Arbeitskreis.

Mein Dank gilt außerdem Herrn Prof. Dr. H. Utsumi, für die Möglichkeit in seinem Labor an der Kyushu-Universität arbeiten zu dürfen, sowie seiner gesamten Arbeitsgruppe für vergnügliche Stunden in Fukuoka.

Herrn Dr. H.-P. Hanssen sei an dieser Stelle für die Beschaffung bibliografische Raritäten und Herrn Dr. H. Brosig für die Synthese von ESR-Spinsonden gedankt.

Nicht vergessen möchte ich den Dank an meine ehemalige Kommilitonin Eike Zimmermann für ihre Freundschaft und Unterstützung während der Anfertigung dieser Arbeit, sowie Leonie Wild fürs Korrekturlesen.

Allen anderen an dieser Arbeit beteiligten Mitarbeitern des Instituts für Pharmazie und der Klinik Dr. Meyburg sei für ihre Zusammenarbeit gedankt.

Kurzfassung

Im Mittelpunkt der Arbeit stehen Betrachtungen zur Mobilität von epikutan applizierten ESR-Spinsonden, sowie noch weitgehend ungeklärte Fragen zu den Wechselwirkungen zwischen Liposomen und Haut. Dazu gehört vor allem die Frage nach der Integrität von epikutan applizierten Liposomen. Weiterhin wurden die Auswirkungen von Liposomen auf die Flexibilität der intercorneozytären Lipiddoppelmembranen, die Penetration von ESR-Spinsonden unterschiedlicher Hydro-/Lipophilie, sowie die Mobilität von ESR-Spinsonden in der Haut und die Polarität ihrer Mikroumgebung untersucht.

Als wichtigste Ergebnisse der Arbeit sind folgende Punkte zu nennen:

- Liposomen verlieren nach epikutaner Applikation ihre Integrität und bilden auf dem Stratum corneum einen Lipidfilm aus. Dabei nimmt nicht nur der Dispersitätsgrad der Liposomen sondern auch die Flexibilität ihrer Membranen ab.
- Entgegen der Erwartung führt die epikutane Applikation von liposomalen Zubereitungen nicht zu einer stärkeren Fluidisierung der intercorneozytären Lipiddoppelmembranen als Phosphatpuffer, wohingegen durch Ölsäure eine deutlich stärkere Fluidisierung erreicht wird.
- Liposomen mit rigiden Membranen führen zu höheren Spinsondenkonzentrationen in der Haut als Liposomen mit fluiden Membranen, und solche aus partialsynthetischen Lipiden führen zu höheren Konzentrationen als Liposomen aus Sojabohnenphospholipiden. Der Vergleich der Penetration von ESR-Spinsonden in die Haut nach epikutaner Applikation von Liposomen mit der Penetration der Spinsonden aus anderen topischen Zubereitungen zeigt, dass eine generelle Aussage zur Penetrationsförderung durch die Anwendung von Liposomen problematisch ist.

- Es konnte ein Polaritätsprofil der Mikroumgebung von Spinsonden in der Haut erstellt werden, das belegt, dass die Polarität in der Epidermis geringer ist als in der Dermis. Mit zunehmender Inkubationsdauer konnte ein Anstieg der Polarität in den Hautproben nachgewiesen werden.
- Die Anwendung eines durch Freed et al. entwickelten Computerprogramms zur Bestimmung von Rotationskorrelationszeiten sich langsam bewegender Moleküle aus Spektren, die mittels spektral-räumlich aufgelöster ESR-Tomografie erhalten wurden, erlaubt die Erstellung von Viskositätsprofilen der oberen Hautschichten in Abhängigkeit von den epikutan applizierten Zubereitungen. Die Bandbreite der ortsabhängig berechneten Rotationskorrelationszeiten von CAT-1 und TEMPOL in der Haut nach epikutaner Applikation der Spinsonden in Liposomen reicht von 5,94 ns bis 1,97 ns. Dies entspricht einer Viskosität der Mikroumgebung von 118 bis 26 mPa·s.

Abstract

The present thesis was focused on the mobility of epicutaneously applied ESR spinprobes and open questions concerning the interactions between liposomes and skin e.g. the integrity of liposomes after epicutaneous application. Additionally the effect of liposomes on the flexibility of lipid membranes in the stratum corneum, the penetration of ESR spinprobes with different hydrophilic / lipophilic properties as well as the mobility and polarity of the microsurrounding of ESR spinprobes in the skin were investigated.

The main results of the investigations are:

- There will be a loss of integrity of epicutaneously applied liposomes and a lipid film will be formed on the stratum corneum. At the same time the degree of dispersity and the flexibility of their membranes decreases.

- Contrary to the expectation the application of liposomal formulations does not lead to a stronger fluidity of the lipid membranes of the stratum corneum than the incubation of the samples with phosphate buffer, whereas the incubation with oleic acid results in a substantial increase of the fluidity.
- The application of ESR spinprobes in liposomes with rigid membranes leads to higher spinprobe concentrations in the skin than with liposomes having fluid membranes. At the same time the application of liposomes made from semi-synthetic lipids leads to higher concentrations of the spinprobe in the skin, than the application of liposomes made from soybean phospholipids. The penetration of spin probes into the skin out of liposomes compared to other topical preparations shows, that a general statement concerning the penetration enhancing effect of liposomes is difficult.
- On using the ESR tomography a polarity profile of the skin was obtained, showing that the polarity in the epidermis is lower than in the dermis. With increasing incubation time of the skin samples the polarity increases.
- The application of a computer program, developed by Freed et al. in order to determine rotational correlation times for slowly tumbling molecules, to spectra, obtained from spectral-spatially resolved ESR tomography, allowed the establishment of viscosity profiles for the upper skin layers in dependency on the applied formulations. The range of the calculated rotational correlation times of CAT-1 and TEMPOL in the skin reaches from 5.94 ns to 1.97 ns. This corresponds to a viscosity of the spinprobes microsurrounding from 118 to 26 mPa·s.

Abkürzungsverzeichnis

a_0	isotrope Stickstoffhyperfeinkopplungskonstante
A_{\max}	äußere maximale Hyperfeinaufspaltung
A_{\min}	innere minimale Hyperfeinaufspaltung
a_N	Stickstoffhyperfeinkopplungskonstante
AT	4-Amino-2,2,5,5-tetramethyl-3-imidazolin-1-oxyl
a.u.	arbitrary units
B_0	magnetische Induktion
CAT-1	2,2,6,6-Tetramethyl-4-trimethylammoniumpiperidin-1-oxyl-iodid
CH	Cholesterol
cw-ESR	continuous wave Elektronenspinresonanz
DOPC	Dioleoylphosphatidylcholin
DPH	1,6-Diphenylhexatrien
DPH-TMA	(1,4-Trimethylammoniumphenyl)-6-phenyl-1,3,5-hexatrienpropionat
DPPC	Dipalmitoylphosphatidylcholin
DPPH	1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl
ESR	Elektronenspinresonanz
HM	2,2,3,4,5,5-Hexamethyl-3-imidazolidin-1-oxyl
LDA	Laser Doppler Anemometrie
LS	Laserdiffraktometrie
NEM	N-Ethylmaleinimide
OSS	Log 10 der „Heisenberg spin exchange rate“
P	Polarisationsindex
PI	Polydispersitätsindex
P80	Phospholipon 80
P80H	Phospholipon 80H
PCS	Photonenkorrelationsspektroskopie
PG	Dipalmitoylphosphatidylglycerol
RBAR	Log 10 des „rotational diffusion tensor“

S	Ordnungsparameter
SC	Stratum corneum
τ_R	Rotationskorrelationszeit
TEMPO	2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-1-oxyl
^{15}N -TEMPO	^{15}N -2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-1-oxyl
TEMPOL	4-Hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl
TEMPOL-benzoat	4-Hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl-benzoat
χ_g	Suszeptibilität

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Zielstellung.....	12
2	Haut und topische Pharmakotherapie.....	16
2.1	Struktur und Funktion der Haut.....	16
2.1.1	Oberflächenfilm der Haut.....	18
2.1.2	Aufbau der Epidermis.....	20
2.1.3	Dermis	31
2.2	Wechselwirkungen zwischen Haut, Arzneistoff und Vehikel.....	33
2.2.1	Eigenschaften des Wirkstoffs	35
2.2.2	Penetrationsenhancer	39
2.2.3	Einfluss des Vehikels	47
3	Untersuchungen, Ergebnisse und Diskussion	71
3.1	Herstellung von Liposomen zum Einsatz in ESR-Untersuchungen.....	71
3.1.1	Lipidgrundlagen für die Liposomenherstellung	71
3.1.2	Herstellung von Liposomen durch Membranextrusion.....	72
3.1.2.1	Herstellung von Liposomen mit variierendem Dipalmitoylphosphatidylglycerol-Gehalt in der Lipiddoppelmembran	73
3.1.2.2	Herstellung von Liposomen mit variierendem Cholesterol-Gehalt in der Lipiddoppelmembran.....	83
	Herstellung von multilamellaren Liposomen	84
	Herstellung von unilamellaren Liposomen	86
3.1.2.3	Herstellung von Liposomen unter Verwendung von Membranfiltern mit variierender Porengröße	92
	Herstellung von Liposomen mit steigendem Anteil der Lipidgrundlage	96
3.1.3	Beladung von Liposomen mit Nitroxylradikalen	99
3.1.3.1	Eingesetzte Nitroxylradikale	99
3.1.3.2	Verteilung von CAT-1, TEMPO, TEMPOL und TEMPOL-benzoat in Liposomenformulierungen	102
3.1.3.3	Kurzzeitstabilität beladener Liposomen.....	108
	Partikelgrößen, Polydispersitätsindex und Zetapotenziale.....	108
	Stabilität von CAT-1, TEMPO, TEMPOL und TEMPOL-benzoat	113
3.1.3.4	Verkapselungseffizienz für CAT-1	114

3.1.3.5	Freisetzung von CAT-1	118
3.1.4	Diskussion	121
3.2	Stabilität von Liposomen nach epikutaner und subkutaner Applikation.....	123
3.2.1	Integrität von Liposomen nach epikutaner Applikation in Abhängigkeit von der Lamellarität und Zusammensetzung ihrer Lipidmembranen	124
3.2.2	Stabilität von multilamellaren Liposomen aus hydrierten Phospholipiden nach epikutaner bzw. subkutaner Applikation	126
3.2.2.1	Freisetzung von CAT-1 aus Presomen [®] C1 bzw. Presomen [®] PPG-I-Liposomen	133
3.2.2.2	Nicht okklusive Applikation.....	137
	Modelluntersuchungen mit Liposomen aus Presomen [®] PPG-I, Presomen [®] C1 bzw. Lösungen	137
	Epikutane Applikation von Presomen [®] PPG-I, Presomen [®] C1 und Lösungen auf exzidierte Maushaut.....	141
	Epikutane Applikation von Presomen [®] PPG-I, Presomen [®] C1 und Lösungen <i>in vivo</i>	145
3.2.2.3	Okklusive Applikation.....	150
	Modelluntersuchungen mit Liposomen aus Presomen [®] PPG-I, Presomen [®] C1 bzw. Lösungen	151
	Epikutane Applikation von Presomen [®] PPG-I, Presomen [®] C1 und Lösungen auf exzidierte Maushaut.....	154
	Epikutane Applikation von Presomen [®] PPG-I, Presomen [®] C1 und Lösungen <i>in vivo</i>	158
3.2.2.4	Subkutane Applikation	161
3.2.3	Diskussion	171
3.3	Wechselwirkungen von Liposomen mit dem Stratum corneum und der Einfluss auf die Mobilität von Spinsonden.....	174
3.3.1	Mobilität von CAT-1 nach epikutaner Applikation von Liposomen	174
3.3.2	Mobilität von 5-Doxylpalmitinsäure in der Membran von Liposomen vor und nach epikutaner Applikation.....	183
	Mobilität von 5-Doxylpalmitinsäure in der Membran von Liposomen	185
	Mobilität von 5-Doxylpalmitinsäure in der Membran von Liposomen nach Applikation auf Parafilm	189
3.3.3	Mobilität von 5-Doxylpalmitinsäure im Stratum corneum nach epikutaner Applikation von Liposomen	194

3.3.4	Diskussion	198
3.4	Fallspezifische Anwendung der ESR-Tomografie	201
3.4.1	Abbildung von Hautschichten mit der ESR-Tomografie	201
3.4.2	Modelluntersuchungen zur ortsabhängigen Mobilität von Spinsonden in Glycerol-Wasser-Mischungen	204
3.4.3	Diskussion	212
3.5	Mobilität von Spinsonden nach epikutaner Applikation von Liposomen	214
3.5.1	Räumliche Verteilung von CAT-1, TEMPOL und TEMPOL-benzoat in der Haut	216
3.5.2	Veränderungen der Polarität der Spinsondenumgebung in der Haut nach epikutaner Applikation von Liposomen	243
3.5.3	Ortsabhängige Mobilität von CAT-1 bzw. TEMPOL in der Haut	253
3.5.4	Diskussion	268
4	Zusammenfassung	273
5	Materialien und Methoden	282
5.1	Materialien	282
5.1.1	Lipidgrundlagen	282
5.1.2	ESR-Spinsonden	282
5.1.3	Fluorophore	282
5.1.4	Weitere Chemikalien	283
5.2	Analytische Methoden	283
5.2.1	ESR-Spektroskopie und –Tomografie	283
	Messfrequenzen	290
	Anforderung an die Proben und Eindringtiefe der elektromagnetischen Strahlung	290
	ESR-Tomografie	291
5.2.2	Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS)	295
5.2.3	Zetapotenzialmessung mittels Laser Doppler Anemometrie (LDA)	296
5.2.4	Fluorimetrie	297
5.2.5	Laserdiffraktometrie	298
5.3	Untersuchungsmethoden	299
5.3.1	Herstellung von Liposomen	299

5.3.2	Herstellung von Liposomen mit variierendem Dipalmitoylphosphatidylglycerol-Gehalt in der Lipiddoppelmembran	300
5.3.3	Herstellung von Liposomen mit variierendem Cholesterol-Gehalt in der Lipiddoppelmembran.....	301
5.3.4	Herstellung von Liposomen unter Verwendung von Membranfiltern mit variierender Porengröße	301
5.3.5	Beladung von Liposomen mit CAT-1, TEMPO, TEMPOL und TEMPOLbenzoat.....	301
5.3.6	Bestimmung der Beladungseffizienz von Liposomen.....	302
5.3.7	Bestimmung der Freisetzung von CAT-1 aus Liposomen	302
5.3.8	Herstellung von Lösungen, Mikroemulsionen und Salben	303
5.3.9	Gewinnung und Inkubation von Humanhautproben	304
5.3.9.1	Bedingungen für ESR-Untersuchungen an Hautproben.....	306
5.3.9.2	Präparation von hitzeseparierter Epidermis.....	306
5.3.10	Integrität von Liposomen nach epikutaner Applikation in Abhängigkeit von der Lamellarität und Zusammensetzung ihrer Lipidmembranen	307
5.3.11	Stabilität von Liposomen aus hydrierten Phospholipiden nach epikutaner und subkutaner Applikation.....	307
5.3.12	Mobilität von CAT-1 nach epikutaner Applikation von Liposomen	308
5.3.13	Mobilität von 5-Doxylpalmitinsäure in der Membran von Liposomen vor und nach epikutaner Applikation.....	309
5.3.14	Mobilität von 5-Doxylpalmitat im Stratum corneum nach epikutaner Applikation von Liposomen	310
5.3.15	Abbildung von Hautschichten mit der ESR-Tomografie	310
5.3.16	Mobilität von Spinsonden nach epikutaner Applikation von Liposomen	310
5.4	Verwendete Geräte	312
6	Literatur	312

1 Einleitung und Zielstellung

In den zurückliegenden Jahren wurde eine Reihe von Anwendungsmöglichkeiten der Elektronenspinresonanz (ESR) im Rahmen der Arzneimittelforschung erschlossen (vgl. [1 – 3]). Diese umfassen den Einsatz der ESR-Spektroskopie und -Tomografie für

- Untersuchungen metabolischer Prozesse, einschließlich der Wechselwirkungen von Proteinen (z. B. Enzymen) mit paramagnetischen Übergangsmetallen im aktiven Zentrum, Bildung radikalischer Metaboliten, Biotransformation und Kinetik von häufig als Spinsonden *in vitro* und *in vivo* verwendeten Nitroxylradikalen sowie ESR-Oximetrie [4 – 28],
- den Nachweis und die Charakterisierung von Radikalen, die bei der Sterilisation von Arzneimitteln durch γ -Strahlen gebildet werden [29 – 31] und
- die nichtinvasive Charakterisierung der strukturellen und dynamischen Eigenschaften von Arzneiträgersystemen (z. B. auf der Basis von bioabbaubaren Polymeren) mit der Spinsondentechnik, die eine kontinuierliche Erfassung der Mikropolarität und Mikroazidität und damit Beiträge zur Aufklärung von Freigabemechanismen sowie eine Optimierung solcher Trägersysteme ermöglichen [6, 27, 30 – 48].

Durch die Etablierung und apparative Adaptation der ESR-Tomografie in der Pharmazie wurden die Voraussetzungen für biopharmazeutische Untersuchungen mit spektraler und räumlicher Auflösung geschaffen. Die Vorteile der ESR-Tomografie gegenüber anderen Untersuchungsmethoden bestehen in der Möglichkeit einer kontinuierlichen, nichtinvasiven Erfassung von Penetrationstiefen, Bewegungsparametern und anderer Eigenschaften der Mikroumgebung der als Modellsubstanzen verwendeten Spinsonden bzw. spinmarkierter Pharmaka. Die Aussagen klassischer Penetrationsuntersuchungen über die Verteilung von Modellsubstanzen bzw. Wirkstoffen in der Haut können daher mit Hilfe der ESR-Tomografie erheblich erweitert werden.

Nachdem gezeigt wurde, dass es prinzipiell möglich ist, die Penetration von Spinsonden oder spinmarkierten Wirkstoffen in die Haut mit Hilfe der ESR-Tomografie spektral-räumlich aufgelöst zu erfassen [27, 42], sollten in der vorliegenden Arbeit die Möglichkeiten zur Differenzierung einzelner Hautschichten geprüft und die ortsaufgelöste Bestimmung der **Rotationskorrelationszeiten** von Spinsonden in definierten Hautschichten durch die Adaption des von Freed [49] für die ESR-Spektroskopie entwickelten Computerprogramms auf der Basis des Spin-Hamilton-Operator-Formalismus weiterentwickelt werden.

Neben der Weiterentwicklung experimentell-methodischer Grundlagen stehen im Mittelpunkt der Arbeit Betrachtungen zur **Mobilität von epikutan applizierten ESR-Spinsonden**, sowie noch weitgehend ungeklärte Fragen zu den **Wechselwirkungen zwischen Liposomen und Haut**. Eine Übersicht über diesbezügliche im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte ESR-Untersuchungen mit Hilfe der Spinsondentechnik gibt Abb. 1. Dazu gehört vor allem die Frage nach der **Integrität** von epikutan applizierten Liposomen als grundlegende Voraussetzung für die vieldiskutierte Möglichkeit einer Penetration intakter Liposomen in das Stratum corneum und tiefere Hautschichten [50 - 55]. Die Durchführung von *In-vitro*- und *In-vivo*-Studien sollte dabei Aussagen zur Vergleichbarkeit der erzielten Ergebnisse erlauben.

Darüber hinaus sollte die Integrität von Liposomen nach deren subkutaner Injektion und die Bedeutung der Vesikelstruktur für den Depoteffekt untersucht werden, der bei der subkutanen Applikation von liposomal eingeschlossenen hochpotenten Arzneistoffen, wie z. B. Morphin, genutzt werden kann [56 - 59].

Ein weiteres Ziel der Arbeit bestand darin, über die Mobilität von hydrophilen und lipophilen Spinsonden einen Einblick in die **Fixierung von Arzneistoffen** auf der Haut und Veränderungen der Phospholipiddoppelmembranen von Liposomen nach deren epikutaner Applikation zu gewinnen.

Fluiditätsänderungen der Stratum-corneum-Lipide durch Bestandteile von epikutan

applizierten Liposomen, die als Ursache für den penetrationsfördernden Effekt von Liposomen gelten [60 - 62], sollten durch die Bestimmung der Mobilität einer in die intercorneozytären Lipiddoppelmembranen inkorporierten Fettsäurespinsonde untersucht werden.

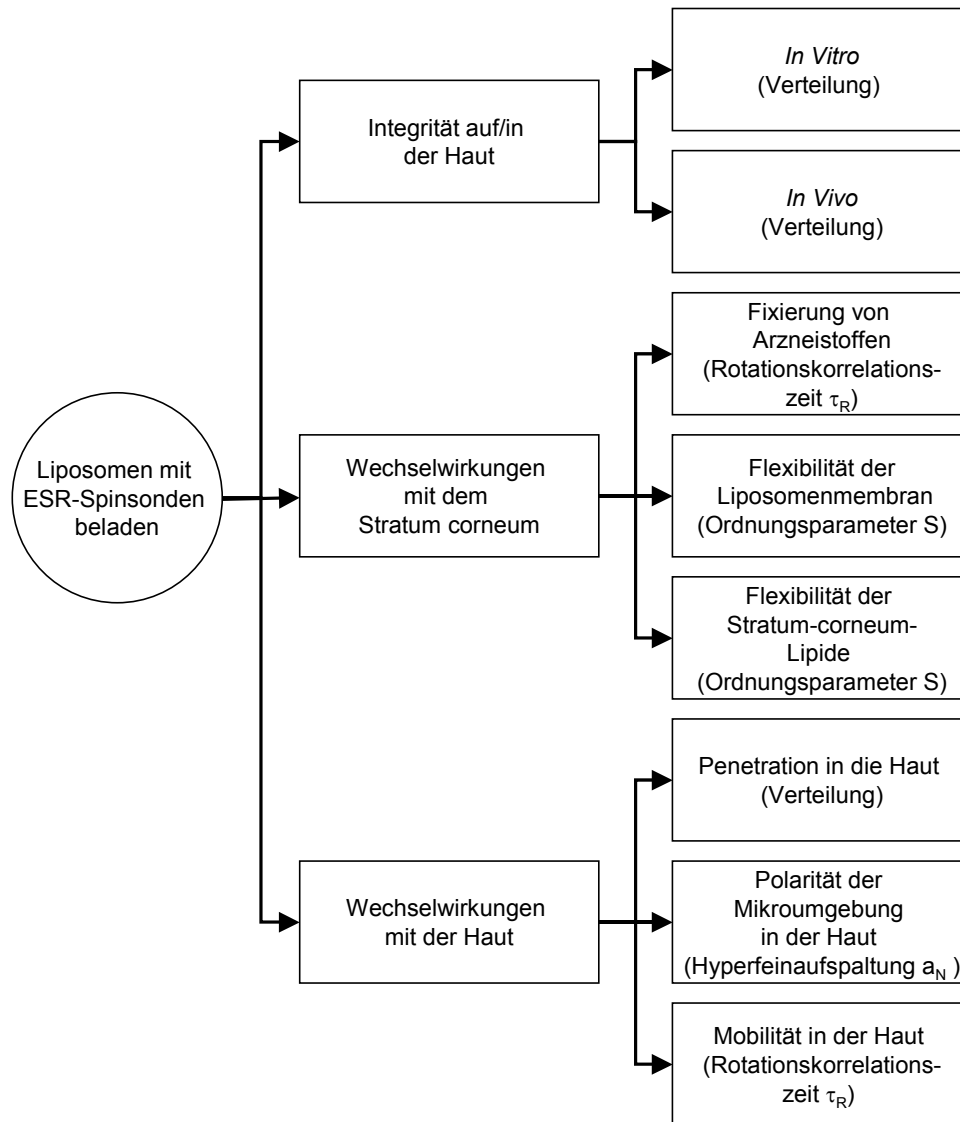


Abb. 1 Übersicht über die Untersuchungen zu den Wechselwirkungen zwischen Liposomen und Haut (mit Angaben zu den jeweils ausgewerteten ESR-Parametern)

Zur weiteren Aufklärung von Wechselwirkungen zwischen Liposomen und der Haut sollten darüber hinaus Änderungen der **Polarität der Mikroumgebung** und der **Mobilität** von Spinsonden in der Haut, d. h. der Epidermis und Dermis durch Bestandteile von epikutan applizierten Liposomen untersucht werden.

Schließlich bestand eine weitere Zielstellung dieser Arbeit in der Durchführung von Transportstudien zur Charakterisierung des **Depoteffektes** und des **penetrationsfördernden Effektes** von Liposomen in Abhängigkeit von der Auswahl der Phospholipidgrundlage, der Fluidität der Liposomenmembranen und der Hydro-/Lipophilie der inkorporierten Spinsonden.

Die Aufklärung der strukturellen und dynamischen Eigenschaften von Liposomen für die perkutane Applikation und der maßgeblichen Faktoren für die Freisetzung und den Wirkstofftransport in die Haut sollten zur Optimierung und Weiterentwicklung topischer Wirkstoffträger beitragen.

2 Haut und topische Pharmakotherapie

2.1 Struktur und Funktion der Haut

Eine der wichtigsten Aufgaben der Haut ist ihre Barrierefunktion, die dem Schutz des Körpers vor exogenen Noxen (Chemikalien, Mikroorganismen und Strahlen) sowie vor dem Verlust körpereigener Substanzen und vor allem von Wasser dient. Daneben erfüllt dieses Organ eine Reihe weiterer wichtiger Aufgaben, die in einem engen Zusammenhang zur Schutzfunktion stehen. Hierzu gehören der Schutz vor mechanischen Verletzungen, die Sinnesfunktionen (Auslösung von Druck- bzw. Tast-, Wärme-, Kälte- und Schmerzempfindungen), Regulationsfunktionen (Körpertemperatur, Wasserhaushalt und Blutdruck), Stoffwechselfunktionen (Synthese und Metabolismus von Stoffen), Exkretionsfunktion (Ausscheidung von Stoffen über Schweiß- und Talgdrüsen) und die Kommunikationsfunktion, die u. a. Mitteilungen des vegetativen Nervensystems (z. B. Erröten, Erblassen, Haarsträuben), die Erzeugung des Eigengeruchs durch apokrine Schweißdrüsen oder die Kommunikation mit inneren Organen (z. B. bei Akupunktur) beinhaltet.

Die Haut ist nicht nur metabolisch, sondern auch immunologisch sehr aktiv (vgl. [63 - 66]). Das hautassoziierte Immunsystem dient einerseits dem Schutz des Organismus vor schädigenden Einflussfaktoren, ist aber andererseits auch an pathologischen Veränderungen beteiligt, wie im Fall der durch T-Lymphozyten vermittelten entzündlichen oder malignen Hautkrankheiten (Ekzeme, Psoriasis, Autoimmunkrankheiten, Lymphome) deutlich wird. Eine genauere Kenntnis der zellulären und molekularen Bestandteile dieses Systems ist somit ein Schlüssel zum besseren Verständnis der Pathogenese dieser Hautkrankheiten und die Grundlage für die Entwicklung neuer Therapiekonzepte.

Die Haut ist nicht in allen Körperregionen gleich aufgebaut, sondern schwankt hinsichtlich ihrer Gesamtdicke, der Dicke der einzelnen Hautschichten, ihrer Ausstattung mit Anhangsgebilden (Nägel, Haare, Talgdrüsen, Schweißdrüsen), ihrer Durchblutung und Innervation in verschiedenen Körperbereichen sowie in Abhängigkeit vom Alter und Geschlecht. Nach der Oberflächenstruktur und dem Feinrelief unterscheidet man die Leistenhaut an den Hand-

tellern, Fingern, Fußsohlen und Zehen von der Felderhaut in den übrigen Körperpartien. Die Leistenhaut zeigt im Unterschied zur Felderhaut eine starke Verzahnung mit der Subcutis und besitzt zwar Schweißdrüsen, jedoch keine Haare und Talgdrüsen.

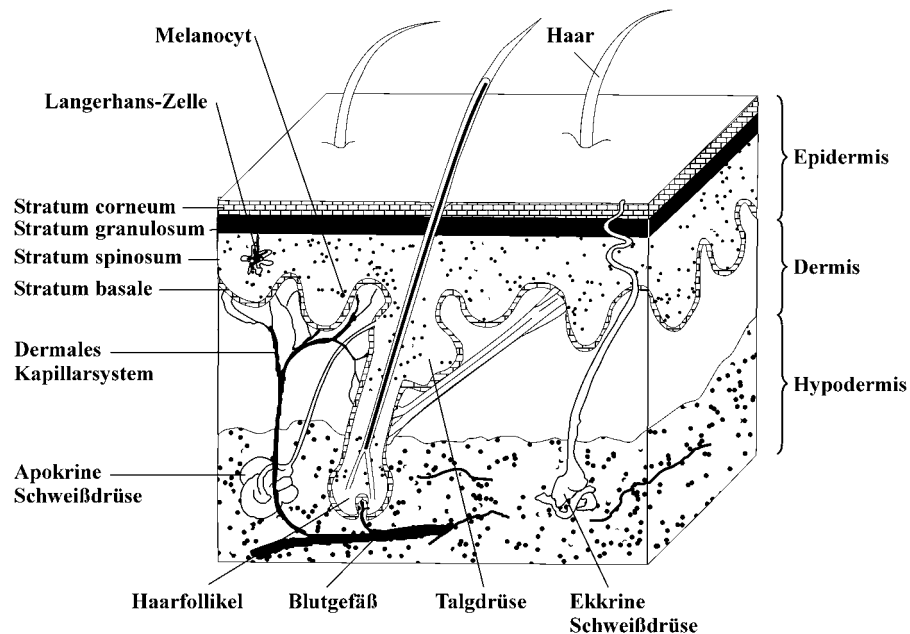


Abb. 2: Struktur und Aufbau der Haut nach *Hotchkiss* [67]

Die eigentliche Haut (Cutis) besteht aus einem ektodermalen Anteil, der Epidermis (Oberhaut) und einem bindegewebigen Anteil, der Dermis (auch als Korium bzw. Lederhaut bezeichnet), die ohne scharfe Grenzen in die Subcutis (Hypodermis, Unterhaut) übergeht (Abb. 2).

Die Epidermis und Dermis werden durch eine hauptsächlich aus Kollagen bestehende Basalmembran voneinander abgegrenzt. Diese Grenze verläuft nicht gerade sondern papillenförmig. Die Epidermis besitzt keine Blutgefäße. Sie wird durch Diffusion aus dem Kapillarsystem der Dermis versorgt. Der obere Gefäßplexus der Dermis nähert sich in den Papillen bis auf etwa 200 µm der Hautoberfläche.

2.1.1 Oberflächenfilm der Haut

Auf der obersten Epidermisschicht, dem Stratum corneum (Hornschicht) befindet sich ein dünner, inkohärenter Oberflächenfilm (0,4 – 10 µm), der bei normaler Oberflächentemperatur (32°C) viskos ist. Dieser emulsionsartige Film setzt sich aus den Produkten der Schweiß- und Talgdrüsen zusammen und kann durch tensidhaltige Reinigungsmittel weitgehend entfernt werden. Dabei resultiert eine trockene, rissige Hautoberfläche, die anfällig gegen Verletzungen und Infektionen ist. Die wichtigste Funktion dieses Schutzfilms besteht offensichtlich in der Regulierung der mikrobiellen Besiedlung der Hautoberfläche. Die Hauptmenge der **wasserlöslichen Stoffe** auf der Haut entfällt auf Produkte der ekkrinen Schweißdrüsen. Es sind hauptsächlich Aminosäuren (45 – 55 % der wasserlöslichen Feststoffe), Salze organischer Säuren (6 – 26 %), wie Lactat, das bei der Energiegewinnung durch anaerobe Glykolyse in den Schweißdrüsen entsteht, Pyroglutamat (ca. 12 %), das durch intramolekulare Wasserabspaltung aus der reichlich im Oberflächenfilm vorkommenden Glutaminsäure gebildet wird und Urocanat (ca. 1 %), das in einer durch Licht induzierbaren enzymatischen Reaktion unter Abspaltung von Ammoniak aus Histidin entsteht. Wegen der UV-Absorption von Urocanat, die der der Nucleinsäuren ähnelt, trägt diese Verbindung zum Lichtschutz der Haut bei. Aufgrund der Bindung von Wassermolekülen durch die organischen Ionen, besonders effektiv sind die hier dominierenden Aminosäuren Citrullin und Serin, da sie mehrere Ladungen pro Molekül enthalten, wird das Eintrocknen des Oberflächenfilms verhindert. An der Feuchthaltung der Hautoberfläche sind auch einige anorganische Salze, besonders Natriumchlorid (ca. 30 %) und Kaliumchlorid (ca. 13 %) und ungeladene polare Stoffe, wie Harnstoff (ca. 3 %), Glucose (ca. 3 %) sowie aus dem apokrinen Schweiß stammende Proteoglykane beteiligt. Die wasserlöslichen Stoffe auf der Haut werden beim Waschen größtenteils entfernt und erneuern sich vollständig innerhalb von 24 Stunden.

Der Oberflächenfilm wird wegen seines schwach sauren pH-Wertes (5,2 – 5,6) auch als Säureschutzmantel bezeichnet, dieser Bereich ist für das Wachstum verschiedener Mikroorganismen, insbesondere der Pilze, ungünstig.

Noch wichtiger als der Säureschutzmantel sind für den Schutz der Haut die auf der Epidermisoberfläche befindlichen **Lipide**. Diese stammen aus den Talgdrüsen (Sebum), im

geringen Umfang auch aus den Zwischenräumen zwischen den verhornten Keratinozyten des Stratum corneum. Es handelt sich vor allem um Triglyceride, freie Fettsäuren sowie Monoglyceride und Diglyceride (entstehen größtenteils erst nach Verlassen der Talgdrüsen durch Einwirkung bakterieller Lipasen), Wachse (hier Ester langkettiger Fettsäuren mit langkettigen Fettalkoholen), Squalen (ungesättigter Kohlenwasserstoff, Zwischenprodukt der Cholesterolsynthese, die in Sebumzellen unvollständig abläuft) sowie Cholesterol, Cholesterolester, Ceramide und Glucoceramide, die im geringen Umfang aus der Hornschicht an die Oberfläche gelangen. Phospholipide, die in den lebenden Schichten der Epidermis und in den Zellen der Talgdrüsen als Hauptbestandteil der Zellmembranen vorkommen, werden bei der Verhornung der Keratinozyten bzw. bei der Enddifferenzierung der Sebumzellen abgebaut und erscheinen nicht an der Hautoberfläche. Die Salze der freien Fettsäuren, Monoglyceride, Diglyceride, Ceramide und Cholesterol wirken als Emulgatoren. Sie bilden aus der Lipid- und Wasserphase eine Emulsion und ermöglichen eine Ausbreitung der Lipide auf der Hautoberfläche.

Mikroorganismen. Die ungewöhnliche Struktur der in den Triglyceriden und Wachsen des Talgs vorkommenden Fettsäuren, die verzweigt und in Position 6 ungesättigt sind, macht diese für die meisten Mikroorganismen unangreifbar und bedingt eine milde antibakterielle und fungizide Wirkung. Darauf und auf der Bildung bakterieller Stoffwechselprodukte wie Propionat (s. u.) beruht die Ansiedlung einer aus nur wenigen Arten bestehenden stabilen Mikroflora. In den oberen Bereichen der Hornschicht findet man vor allem Bakterienarten der Gattungen *Staphylococcus*, *Micrococcus* und *Corynebacterium* sowie *Brevibacterium epidermidis*. Sie nutzen die auf der Hautoberfläche vorhandenen Nährstoffe wie Aminosäuren, Lactat oder Fettsäuren und verstoffwechseln diese aerob überwiegend zu Kohlendioxid und Wasser.

In den Haarfollikeln kommen Stämme von *Propionibacterium* vor, die ihre Energie durch anaeroben Stoffwechsel von Glycerin, das sie mit Hilfe eigener Lipasen aus den Fetten des Sebums abspalten, zu Pyruvat gewinnen. Das dabei durch die Reduktion von Pyruvat entstehende Propionat wirkt als Hemmstoff für andere Mikroorganismen.

2.1.2 Aufbau der Epidermis

Der Querschnitt durch die Epidermis lässt mikroskopisch mehrere Schichten erkennen (s. Abb. 2). Diese enthalten hauptsächlich **Keratinozyten**, die sich in verschiedenen Funktionszuständen befinden und auch morphologisch unterschiedlich differenziert sind. Die Differenzierung der Keratinozyten verläuft ausgehend von den jungen Zellen des **Stratum basale** (Basalschicht) über die Zellen des **Stratum spinosum** (Stachelzellschicht) und das **Stratum granulosum** (Körnerschicht) zu den nicht mehr teilungsfähigen verhornten Korneozyten des **Stratum corneum**. Infolge der häufigen Teilung der Basalzellen finden diese nicht mehr alle auf der Basalmembran Platz und werden ständig nach außen abgedrängt. Dabei füllen sie sich zunehmend mit Keratin und werden immer flacher. Bereits im Stratum granulosum wird das vermehrt gebildete Keratin in den Keratinozyten lichtmikroskopisch in Form von Keratohyalin granula sichtbar. Im Stratum corneum sind die Keratinozyten zu leblosen Korneozyten geworden, deren normaler Stoffwechsel zum Erliegen gekommen ist, deren Zellkerne abgebaut sind und deren Zellmembranen durch eine spezielle Lipidschicht ersetzt wurde. Die Korneozyten werden, wenn sie bis zur Hautoberfläche vorgeschoben worden sind, in Form von Hornschuppen abgestoßen (Desquamation). Der Prozess von der Zellteilung in der Basalschicht bis zur Desquamation dauert normalerweise etwa 30 Tage, kann jedoch bei Erkrankungen mit epidermaler Hyperproliferation (z.B. Psoriasis) auf ca. vier Tage reduziert sein.

Die Keratinozyten sind miteinander durch Desmosomen verknüpft. Dies sind plattenförmige, überwiegend aus Proteinen bestehende Anhänge der Zellmembran, die im Zytoskelett verankert sind. Im Stratum spinosum erscheinen die Desmosomen in Form von Stacheln. Dem Abstreifen der Hornschuppen in der äußeren Hornschicht geht eine Auflösung der Desmosomen voraus.

Die Korneozyten bestehen aus dicht gepackten Bündeln von Keratinfasern und anderen Proteinen. Diese sind von einer dünnen Hornhülle aus Loricin (s.u.) und anderen unlöslichen Proteinen umgeben. Trotz der dichten Packung der Keratinbündel enthalten die Korneozyten noch über 50 % Wasser. Die Oberfläche der Korneozyten ist lipophil, da in der Zellhülle Fettsäuren kovalent an Seitenketten der quervernetzten Proteine gebunden sind.

Die gesamte Epidermis ist etwa 100 µm dick. Davon entfallen etwa 1/5 auf das Stratum corneum, das normalerweise aus 15 bis 20 Lagen von Korneozyten besteht. Allerdings kann die Hornschicht und damit auch die gesamte Epidermis erheblich dicker sein, vor allem auf Handflächen und Fußsohlen.

Die Keratinozyten sind in verschiedener Weise am Immunsystem beteiligt, indem sie als Phagozyten fungieren und nach Stimulation verschiedene Interleukine, Prostaglandine, Leukotriene und andere Mediatoren exprimieren können.

Ferner können aktivierte Keratinozyten MHC-Klasse-II-Antigene und Adhäsionsmoleküle exprimieren, denen eine entscheidende Funktion bei der Bindung von T-Lymphozyten, z.B. bei Psoriasis, verschiedenen Ekzemen oder bei Lupus erythematodes, zukommt. Bei diesen Hautentzündungen liegen daher T-Lymphozyten in engem Kontakt zu zerstörten Keratinozyten als Ergebnis einer zytotoxischen Attacke durch aktivierte T-Zellen vor. Andererseits findet man auch intakte Keratinozyten neben proliferierenden T-Zellen. Möglicherweise können diese Keratinozyten die T-Zellen aktivieren [65].

T-Lymphozyten kommen nicht nur in entzündeter, sondern auch in normaler Haut vor, hauptsächlich in der Dermis in der Umgebung von Gefäßen, teilweise jedoch auch in der Epidermis. Sie stellen eine distinkte Subpopulation von T-Zellen dar, die bevorzugt in die Haut einwandert (skin homing T-cells) und ein bestimmtes Glykoprotein tragen, das durch den Antikörper HECA-452 erkannt wird. Dort stehen sie bereit, um die Antigene, die in die Haut eindringen, zu erkennen und zu attackieren. Klinisch kann sich dies als Hautentzündung (Ekzeme, Psoriasis, Lichen ruber) manifestieren (vgl. [66]).

Gewebsmakrophagen und **dendritische Zellen** finden sich in normaler Haut in der Dermis in der Umgebung von Gefäßen. Bei Entzündungen nimmt ihre Zahl dramatisch zu und es erfolgt eine Einwanderung in die Epidermis. Früher wurden sie kollektiv als Histiozyten bezeichnet. Trotz ihres gemeinsamen Ursprungs im Knochenmark unterscheiden sich beide Zelltypen jedoch in Bezug auf ihre Morphologie und Funktion. Gewebsmakrophagen können wegen ihrer exzellenten Phagozytosefähigkeit große Partikel (z.B. Fremdkörper, Bakterien, Parasiten) eliminieren oder abkapseln und sind daher an der Bildung von Granulomen

beteiligt. Sie bedienen sich bei ihrer Abwehrfunktion einer Vielzahl von Wirksubstanzen (u.a. Zytokine, reaktive Sauerstoffspezies) und treten mit den T-Zellen in Wechselwirkung. Dendritische Zellen dienen dagegen der Antigenpräsentation und sind auf die Aktivierung von T-Zellen spezialisiert. Sie stellen vermutlich die dermalen Vorläufer der epidermalen Langerhans-Zellen dar [64].

Die **Langerhans-Zellen** sind potente Immunzellen, die in normaler Epidermis vor allem im Stratum spinosum vorkommen. Sie sind durch ihre dendritische Morphologie und spezifische Oberflächenmoleküle (z.B. MHC-Klasse-I-, II- oder CD1a-Moleküle) gekennzeichnet. Ihre Hauptfunktion ist die Induktion T-Zell-vermittelter Immunantworten vom verzögerten Typ (Typ IV-Reaktionen) in der Haut, z.B. bei allergischen Kontaktekzemen oder Transplantatabstoßungen. Darüber hinaus können sie auch Immunantworten gegen Antigene von Bakterien, Viren und Tumorzellen auslösen.

Die primär für die Abwehr von Bakterien und Pilzen relevanten **neutrophilen Granulozyten (Neutrophile)** wandern unter Beteiligung von vermehrt auf der Oberfläche von Endothelzellen der Dermis (s.u.) exprimierten Adhäsionsmolekülen bei bestimmten entzündlichen Erkrankungen, z.B. im aktiven Stadium der Schuppenflechte (Psoriasis) in die Epidermis ein. Als selektiver epidermaler Lockstoff für Neutrophile konnte das in Hautschuppen von Psoriasispatienten nachgewiesene Interleukin IL-8 identifiziert werden. IL-8 dürfte unter den zahlreichen bei Psoriasis mitwirkenden Mediatoren eine Schlüsselrolle besitzen, da es gleichzeitig mitogene Wirkung auf Keratinozyten besitzt und somit maßgeblich an den beiden herausragenden Merkmalen dieser Erkrankung beteiligt ist, nämlich an der vor allem durch Neutrophile eingeleiteten Entzündung und an der Hyperproliferation der Keratinozyten, die zu einer Verkürzung der Transitzeit von der Zellteilung bis zur Abstoßung an der Oberfläche auf drei bis vier Tage führt.

Weitere im Vergleich zu den Keratinozyten seltener vorkommende Zellen der Epidermis sind die **Melanozyten**, die hauptsächlich in der Basalschicht vorkommen und für die Produktion des braunen Hautpigments Melanin verantwortlich sind, sowie die **Merkel-Zellen** an der Grenze zur Dermis. Hierbei handelt es sich um spezialisierte Epithelzellen, die mit verzweig-

ten Endästen eines Axons synaptisch verbunden sind (Merkel-Zell-Axon-Komplex) und als druckempfindliche Sensoren fungieren.

Gerüstproteine der Epidermis. Die Keratinfasern der Korneozyten, Haare und Nägel sind die wichtigsten Gerüstproteine der Epidermis. Die **Zytokeratine** repräsentieren eine Klasse von mindestens 30 genetisch verwandten Gerüstproteinen. Unterschiedliche Vertreter dieser Klasse treten als charakteristische Bestandteile des Zytoskeletts verschiedener Gewebe auf, so dass sie oft als Marker für verschiedene Zelltypen oder Stadien der Zelldifferenzierung verwendet werden.

Die Keratine der menschlichen Hornsubstanz haben einen relativ hohen Gehalt an Cysteinseitenketten, die zu **Disulfidbrücken** verknüpft sind. Durch diese Vernetzung sind die Keratine unlöslich und mechanisch sehr stabil. Das harte Keratin der Nägel hat den höchsten Gehalt an Cystein, während das weiche Keratin der Haut einen geringeren Cysteingehalt aufweist und das Keratin der Haare hinsichtlich der Härte und des Cysteingehaltes eine Zwischenstellung einnimmt.

Ein zweiter Typ der kovalenten Quervernetzung zwischen Proteinmolekülen der Epidermis resultiert aus **Säureamid-Bindungen** zwischen Glutamin- und Lysin-Seitenketten, die durch das Enzym Transglutaminase geknüpft werden. Dieses Enzym wird erst bei der Differenzierung der Keratinozyten aktiviert und ist an der Bildung der Hornhülle des Keratinozyten (cornified envelope) beteiligt.

Zusammen mit den Keratinen treten in den menschlichen Hornsubstanzen kleinere Proteinmoleküle auf, die im Stratum corneum auch als **Filaggrine** bezeichnet werden. Diese polymerisieren bei der Differenzierung mit den Keratin-Mikrofibrillen zu Makrofibrillen und werden deshalb auch als Kittsubstanzen bezeichnet. Einige Typen von Filaggrinen enthalten am N-terminalen Teil ihrer Proteinkette einen Urocainsäurerest, der als Lichtschutz der Haut eine gewisse Rolle spielt (s.o.). Die zu größeren Einheiten zusammengelagerten Keratinfilamente ($d = 7 - 10 \text{ nm}$) sind in den Korneozyten in eine amorphe Matrix aus schwefelreichen Proteinen eingebettet. Das Wasser in den Korneozyten ist zum größten Teil über Wasserstoffbrücken an Keratin gebunden.

Das globuläre schwefelreiche Protein **Loricin** bildet etwa 50 % der Hornhülle. Es wird bei der Differenzierung der Keratinozyten zu Korneozyten durch die Transglutaminase in deren Hülle eingebunden. Loricin wird besonders stark in feuchter Umgebung exprimiert. Das Protein **Involukrin** wird mit Hilfe der Transglutaminase an die Innenseite der Hornhülle gebunden. Loricin und Involukrin tragen wahrscheinlich wesentlich zur Wasserundurchlässigkeit der Hornschicht bei.

Lipide der Epidermis. Die epidermalen Lipide haben einen wesentlichen Anteil an der **Barrierefunktion der Hornschicht**. Nach dem von Elias [68 - 71] entwickelten Ziegel-Mörtel-Modell ist das Stratum corneum als die entscheidende Permeationsbarriere der Haut mit einer Wand zu vergleichen, deren Ziegel die Korneozyten sind und deren Zwischenräume vollständig mit Lipiden als Mörtel ausgefüllt werden. Allerdings sind am Zusammenhalt der Korneozyten auch die Desmosomen (s.o.) maßgeblich beteiligt. Das Stratum corneum ist im trockenen Zustand nur etwa halb so dick wie ein Blatt Papier (ca. 20 µm, 1/5 der Epidermis), kann aber bei starker Hydratisierung zu einem Vielfachen dieser Dicke aufquellen.

Die Lipide der Hornschicht werden überwiegend in den Keratinozyten synthetisiert und dort zunächst als lamellenförmige Lipidgranula (lamellar bodies, Odlandkörperchen) gespeichert [71]. Die **Odlandkörperchen** (Lamellargranula) treten erstmalig in den obersten Lagen des Stratum spinosum auf und lassen sich elektronenmikroskopisch vor allem in den Zellen der Körnerschicht erkennen. Sie bestehen aus dichten Stapeln abgeflachter „Liposomenscheiben“ mit komplexer Lipidzusammensetzung, die sich vom Golgi-Apparat des Keratinozyten ableiten. Neben Phospholipiden und freien Sterolen (vorwiegend Cholesterol) enthalten sie Glykosphingolipide, und Glykoproteine sowie hydrolytische Enzyme, einschließlich saurer Phosphatase. In den obersten Schichten des Stratum granulosum verschmelzen die äußeren Membranen der Lamellargranula mit der Zellmembran und entleeren ihren Lipidinhalt in den interzellulären Raum des Stratum corneum. Hier werden die polaren Phospholipide und Glykosphingolipide unter dem Einfluss der hydrolytischen Enzyme gespalten und es entstehen vor allem freie Fettsäuren und Ceramide. Unter Mitwirkung von Calciumionen führt die Änderung der Lipidzusammensetzung zu einer End-zu-End-Verschmelzung der diskoiden Lamellarkörperchen und Reorganisation zu breiten multiplen Lipidlamellen von 4 – 6 nm Dicke, die parallel zur Hautoberfläche den Interzellulärraum des Stratum corneum

durchziehen. Abgesehen von der oberflächlichen Desquamationszone bilden die Hornschichtlipide ein hochgeordnetes Gefüge, das aus heutiger Sicht als morphologisches Äquivalent der Permeationsbarriere zu betrachten ist. Erst in den oberen, aufgelockert erscheinenden Lagen des Stratum corneum gehen die Organisation der Lipide sowie die Kohärenz der Korneozyten verloren und es kommt zur Desquamation.

Im Verlauf der Keratinozytendifferenzierung erfolgt demnach eine dramatische Veränderung der Lipidzusammensetzung. Während die Keratinozyten im Stratum basale und Stratum spinosum die gleichen Lipide wie die meisten anderen Zellen enthalten, nämlich vor allem die Bausteine der inneren und äußeren Zellmembranen, wie Phospholipide und Cholesterol, kommt es im Stratum granulosum zu einer starken Abnahme der Phospholipide und einer Zunahme an Sphingolipiden (Ceramide und Glykosylceramide, vor allem mit Glucose glykosidisch verknüpfte Ceramide) und Cholesterol. Bemerkenswert ist das Auftreten von Cholesterolsulfat, für das eine Schlüsselrolle bei der terminalen Differenzierung und Desquamation vermutet wird.

Im Stratum corneum können kaum noch Phospholipide und Glykosylceramide nachgewiesen werden, dafür dominieren die Ceramide neben Cholesterol, Cholesterolestern, freien Fettsäuren sowie geringeren Anteilen von Triglyceriden (vgl. Tab. 1, [73 – 76]). In der äußeren Hornschicht findet man auch aus dem Sebum stammende Lipide.

Zunächst wurden aufgrund ihrer Strukturmerkmale im Stratum corneum des Menschen sechs **Ceramidfraktionen** unterschieden, die analog zu den in Schweinehaut nachgewiesenen Ceramiden als Ceramide 1, 2, 3, 4/5, 6I und 6II bezeichnet wurden [74, 77]. Diese frühere Klassifizierung wurde inzwischen revidiert, da zwischen den früheren Ceramiden 3 und 4 eine weitere Fraktion und der Aminoalkohol 6-Hydroxy-4-sphingenin als neuer Baustein entdeckt wurden [78]. Gegenwärtig werden die Ceramidfraktionen 1 – 7 unterschieden (vgl. Abb. 3), wobei Ceramid 1 bei der HPTLC die geringste und Ceramid 7 die höchste Polarität aufweist. Daneben ist eine Einteilung vorgeschlagen worden, die sich nicht mehr am chromatografischen Laufverhalten orientiert, sondern an strukturellen Merkmalen und einen Buchstabencode verwendet [79]. Grundkörper der Ceramide (Sphingolipide) sind langkettige Aminoalkohole, an deren primäre Aminogruppe amidartig eine Fettsäure gebunden ist.

Als Grundstrukturen weisen die Ceramide aus dem menschlichen Stratum corneum die Aminoalkohole 4-Sphingenin (Sphingosin = S), 4-Hydroxysphinganin (Phytosphingosin = P) oder 6-Hydroxy-4-sphingenin (H) auf. Bei den amidartig gebundenen Fettsäuren handelt es sich um Nichthydroxyfettsäuren (N), α -Hydroxysäuren (A) oder ω -Hydroxysäuren, die ihrerseits mit einer Nichthydroxyfettsäure, z.T. Linolsäure, verestert sind (ester-linked fatty acid, ω -hydroxyacid = EO).

Tabelle 1 Zusammensetzung der Hornschichtlipide der menschlichen Haut (nach [76])

Verbindung ^{a)}	Anteil an der Gesamtlipidmenge (%)
Ceramid 1	3,2
Ceramid 2	8,9
Ceramid 3	4,9
Ceramid 4	6,1
Ceramid 5	5,7
Ceramid 6	12,3
Cholesterol	26,9
org. Cholesterolester	10,0
Cholesterolsulfat	1,9
Fettsäuren	9,1
Andere Substanzen	11,1

^{a)} alte Bezeichnung der Ceramide

Die Stratum corneum-Lipide mit den Ceramiden als entscheidendem Ordnungsfaktor bilden zwischen den Korneozyten 15 – 20 Lipid-Doppelschichten, die die Hornschicht kontinuierlich durchziehen. Ihr Zusammenhalt beruht zunächst auf den elektrostatischen Wechselwirkungen der polaren Kopfgruppen und den hydrophoben Wechselwirkungen zwischen den Alkylketten.

Im Bereich der relativ kleinen polaren Kopfgruppen kommt es zu einer begrenzten Hydratation (s. Abb. 4). Weiterhin konnten in den interzellulären Domänen mit den Lipiden assoziierte Proteine nachgewiesen werden. Im gewissen Umfang können die interzellulären Lipide durch kovalente Bindungen an Proteine der Korneozytenoberfläche immobilisiert sein. Für die Stabilität dieser hochgeordneten Überstrukturen in Form der verzahnten multiplen Lipid-Doppellamellen, die einen effektiven Schutz vor transepidermalemem Wasserverlust und oxidativen Schädigungen gewährleisten, sind nicht zuletzt die unterschiedlich langen, vorwiegend gesättigten und unverzweigten Kohlenwasserstoffketten der Ceramide maßgeblich. Zusam-

men mit den anderen Hornschichtlipiden wie Cholesterol, Cholesteroler, Cholesterol-sulfat und freien Fettsäuren liegen sie in einer kristallinen (gelartigen) Lipidstruktur vor, die ein erhebliches Diffusionshindernis darstellt.

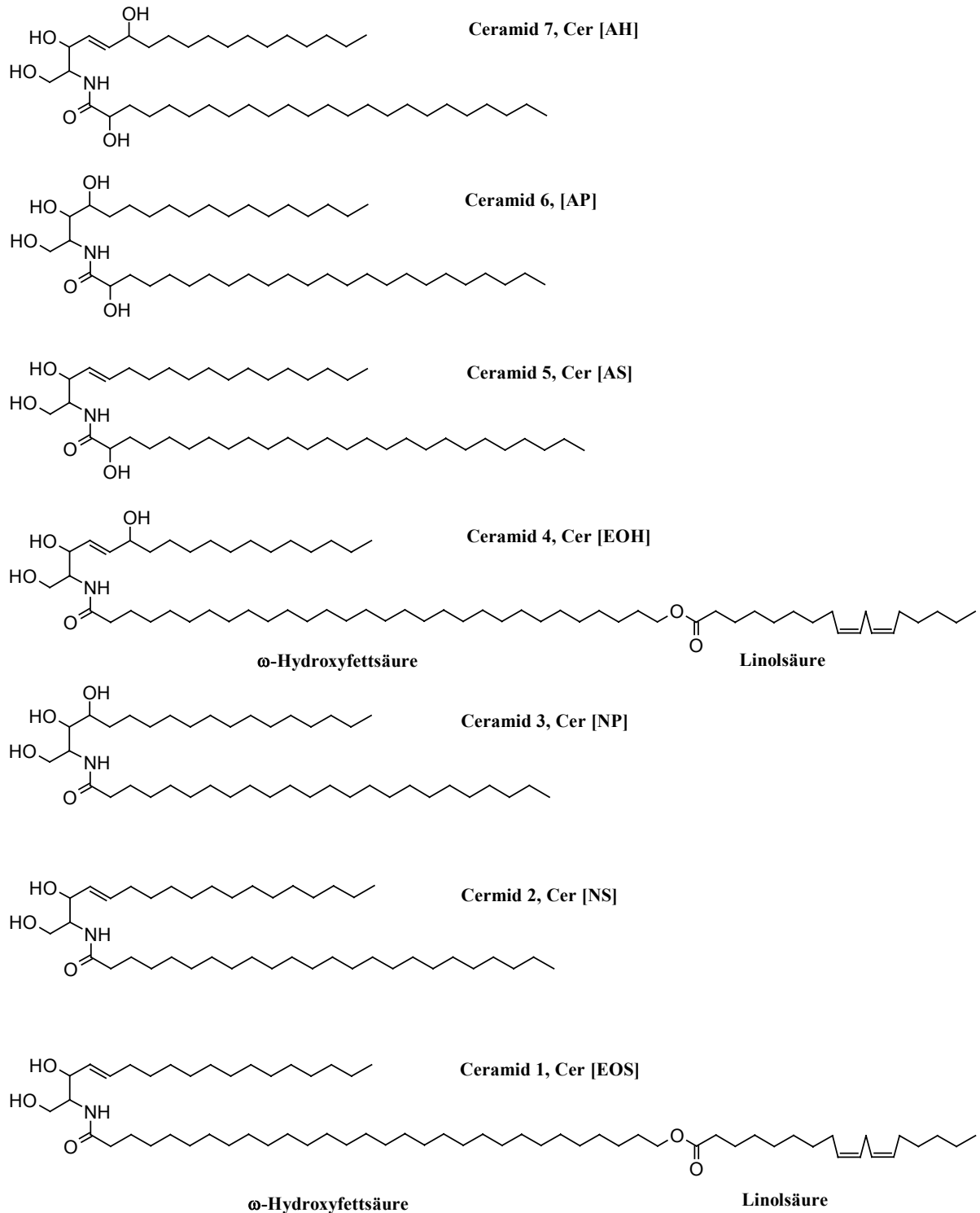


Abb. 3 Strukturen der Ceramide 1 bis 7 der menschlichen Hornschicht und ihre Bezeichnung mit dem Buchstabencode nach [79]

Eine besondere Bedeutung kommt offensichtlich den mit Linolsäure veresterten Ceramiden 1 und 4 zu. Diese sollen aufgrund ihrer ungewöhnlichen Kettenlängen als „molekulare Nieten“ für den festen Zusammenhalt der Lipid-Doppelschichten verantwortlich sein, indem sie eine gesamte Doppelschicht durchspannen und mit der Linolsäurekette in die folgende Doppelschicht hineinragen. Bei einem Mangel an essentiellen Fettsäuren konnte tierexperimentell eine gestörte Barrierefunktion der Hornschicht nachgewiesen werden, die mit einem Defizit an linolsäurehaltigen Ceramiden erklärt wird. Stattdessen werden ölsäurehaltige Ceramide gebildet, die nicht in der Lage sind, Lipid-Doppellamellen miteinander zu verbinden [93]. Die Bedeutung der Linolsäure für die Barrierefunktion der Hornschicht wird auch dadurch unterstrichen, dass der verstärkte transepidermale Wasserverlust z.B. bei Psoriasis durch vermehrte Gabe dieser essentiellen Fettsäure eingeschränkt werden kann.

Für den Zusammenhalt der Hornschicht scheint auch Cholesterolsulfat eine wichtige Rolle zu spielen. Die enzymatische Spaltung durch Steroidsulfatase führt zu einer Destabilisierung der multiplen Lipid-Doppellamellen und zur Desquamation.

Belegt ist die Bedeutung der Ceramide für das Wasserbindungsvermögen der Hornschicht (s.u.). So kommt es nach Delipidierung der Hornschicht *in vivo* zu einer deutlichen Verringerung der Hydratation, die am besten durch lokale Applikation von Ceramiden rückgängig gemacht werden kann. Geringere Effekte zeigen Glykolipide und freie Sterole, während freie Fettsäuren und Cholesterolester wirkungslos sind [94].

Neben der besonderen Architektur und der einmaligen Lipidzusammensetzung der multiplen Lipid-Doppellmembranen ist auch die Größe des interzellulären Raums der Hornschicht mit einem Volumenanteil von 10 bis 30 % bemerkenswert (in andern Geweben 0,1 – 1,5 %).

Hydratation der Hornschicht. Der für die Barrierefunktion (das Penetrationsvermögen), die Geschmeidigkeit und das Aussehen der Haut maßgebliche Feuchtigkeitsgrad der Hornschicht (10 bis 20 %) hängt wesentlich von der Anwesenheit von Substanzen des natürlichen, hauteigenen Feuchthaltesystems (Natural Moisturizing Factor = NMF) ab, die im Stratum corneum vorliegen und hier durch die Lipide vor dem Ausschwemmen geschützt werden. Es

handelt sich dabei um ein komplexes Gemisch aus Aminosäuren, Natrium- und Kaliumchlorid, Lactate, Harnstoff, Natrium-2-Pyrrolidon-5-carboxylat (effektivste Einzelkomponente) und anderen hydrophilen Komponenten (vgl. [81]). Ihre Anwesenheit gilt als Voraussetzung dafür, dass die Proteinstrukturen der Hornschicht ihre native Geometrie aufrechterhalten können.

Weiterhin wird vermutet, dass die Stratum corneum-Lipide, insbesondere die Ceramide (s.o.) eine Art Puffersystem für die Aufrechterhaltung eines bestimmten Feuchtigkeitsgrades der Hornschicht und der Hautoberfläche darstellen, indem sie Wasser assoziieren und bei Bedarf wieder abgeben können.

Wirkstoffpenetration in die Haut. Ausgehend von der Struktur des Stratum corneum, der eigentlichen Permeationsbarriere der Haut, existieren für Wirkstoffe prinzipiell drei mögliche Transportwege (vgl. Abb. 4),

- der transzelluläre Weg,
- der interzelluläre Weg sowie
- der transfollikuläre und transglanduläre Weg.

Während bis vor wenigen Jahren angenommen wurde, dass zumindest polare Wirkstoffe im wesentlichen über den transzellulären Weg das Stratum corneum passieren und selbst bei unpolaren Stoffen die Dominanz der interzellulären Passage als ungesichert betrachtet wurde, geht man heute allgemein von einem überwiegend interzellulären Transportweg auch bei kleineren hydrophilen Molekülen aus [82]. Dabei hängt die Fähigkeit des Wirkstoffs, das Stratum corneum zu überwinden, u.a. von der Löslichkeit, den Verteilungskoeffizienten an den Phasengrenzen und den Diffusionskoeffizienten in den einzelnen Phasen ab. Wirkstoffe mit ausreichender Lipophilie diffundieren lateral durch die bimolekularen Lipidphasen der Wasser-Lipid-Doppelschichten (apolare Route, vgl. Abb. 5). Kleinere hydrophile Moleküle (z. B. Harnstoff und Propylenglycol) gelangen wahrscheinlich über die polare Route in und durch das Stratum corneum. Allerdings ist über diesen Transportweg gegenwärtig nur wenig bekannt.

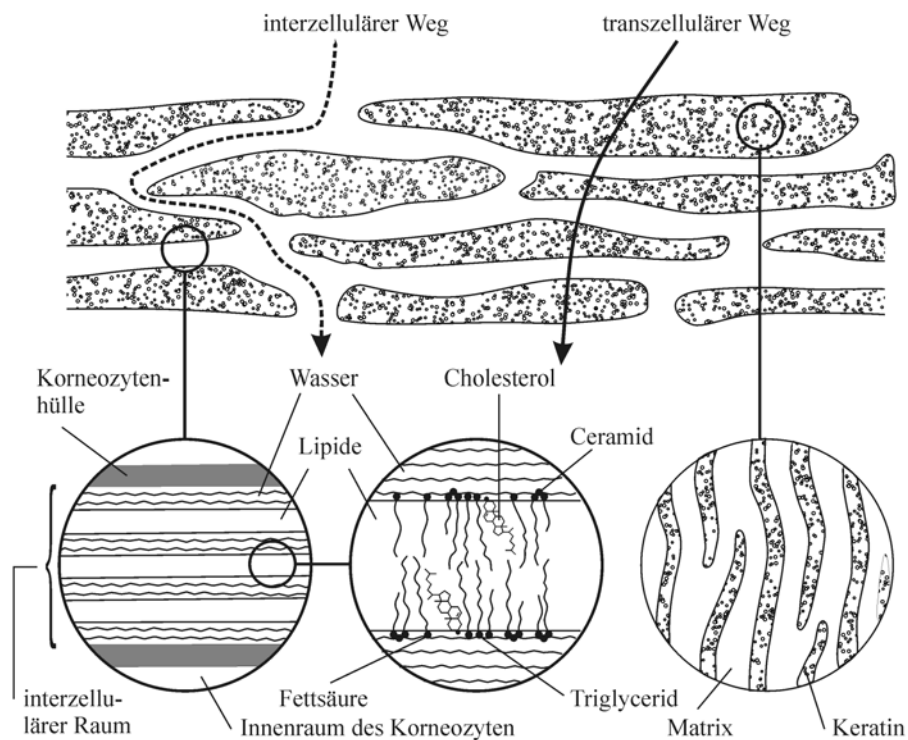


Abb. 4 Stratum corneum der menschlichen Haut: Schematischer Aufbau und mögliche Penetrationswege für Wirkstoffe (modifiziert nach Barry [80])

Für den Übergang in die polaren Schichten der lebenden Epidermis ist eine gewisse Hydrophilie des Wirkstoffs erforderlich (s. 2.2.). Lipophile Stoffe mit sehr hohem Lipid/Wasser-Verteilungskoeffizienten können in der Lipidphase zwischen den Korneozyten angereichert und aus diesem Depot nur langsam in die tieferen Hautschichten abgegeben werden.

Die Bedeutung des transfollikulären und transglandulären Wegs für die perkutane Wirkstoffaufnahme wird kontrovers diskutiert. Aufgrund des geringen Flächenanteils (beim Menschen ca. 0,1 % der unbehaarten Haut) wird diese Route von verschiedenen Autoren als nicht relevant bezeichnet (vgl. [83]). Andere Autoren betrachten diesen Weg dagegen als entscheidend für die Hautpermeation von Elektrolyten und hydrophilen höhermolekularen Verbindungen (z. B. Peptid-, Glucosamin- und Makrolidantibiotika, sowie Hydrocortison [84]). Außerdem soll dieser sog. "shunt"-Weg der Hauptweg zu Beginn des Penetrationsvorgangs sein, bevor ein steady-state-Flux erreicht wird. Während in Tierversuchen z. T. eine erhebliche Aufnahme von Steroiden über Talgdrüsen und Haarfollikel nachgewiesen wurde [85, 86], liegen für Humanhaut z. T. widersprüchliche Befunde vor (vgl. [87 – 89]). Allerdings unterstreichen Untersuchungen nach schichtweiser Entfernung des Stratum corneum (durch Abstreifen mit

Tesa-Film), bei denen der perkutane Flux der Testsubstanzen um ein Vielfaches anstieg, die Bedeutung der Hornschicht als entscheidender Pemeationsbarriere [90, 91]. Der transfollikuläre und transglanduläre Weg scheint demnach vor allem für große, polare Moleküle und kurze Diffusionszeiten eine gewisse Rolle zu spielen.

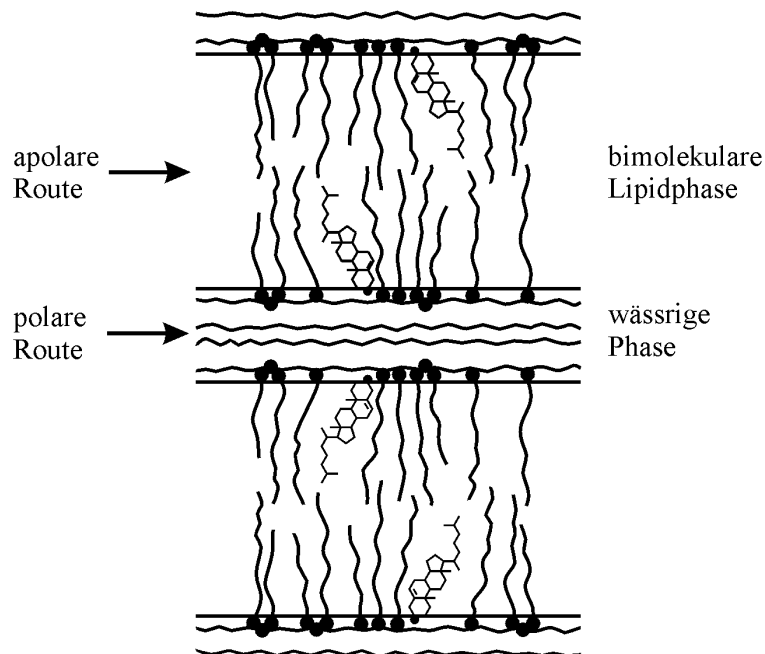


Abb. 5 Apolarer und polarer Transportweg durch die Wasser-Lipid-Doppelschichten des Stratum corneum

2.1.3 Dermis

Die Dermis ist je nach Lokalisation 4 bis 15 mal dicker als die Epidermis. Sie besteht aus dem Stratum papillare und dem Stratum reticulare. Diese beiden Schichten unterscheiden sich vor allem in der Stärke und Anordnung ihrer kollagenen und elastischen Bindegewebsfasern. Wesentliche Bestandteile der Dermis sind neben den Kollagen- und Elastinfasern sowie der vorwiegend aus Hyaluronsäure bestehenden Grundsubstanz, Fibroblasten, Mastzellen, Gewebsmakrophagen und dendritische Zellen (s.o.), Blut- und Lymphgefäße, sowie Nervenfasern mit ihren rezeptorischen Endapparaten.

Die in die Dermis hineinragenden Hautanhangsgebilde, wie Haarfollikel mit Talg- und

apokrinen Drüsen (Duftdrüsen), ekkrine Schweißdrüsen und Nägel, sind zwar ektodermalen Ursprungs, entstehen aber erst durch Induktion unter dem Einfluss noch weitgehend unbekannter mesodermaler Faktoren.

Als Produkte der **Fibroblasten** sind zu nennen Typ-I-Kollagen (20 nm breite, mechanisch sehr stabile, vorwiegend im Stratum reticulare parallel zur Epidermis verlaufende Kollagenbündel), Typ-III-Kollagen (1,5 nm dünne kollagene Fasern, die scheinbar ungeordnet vorwiegend im Stratum papillare liegen), die elastischen Fasern, Mikrofibrillen, die in Elastin eingebettet sind (im S. papillare senkrecht zur Epidermis und im S. reticulare zwischen den Kollagenbündeln angeordnet) sowie die Grundsubstanz (s.o.).

Mastzellen als wichtige Bestandteile des dermalen Immunsystems liegen in der Nähe von Gefäßen und Nervenfasern. Ein ultrastrukturelles Charakteristikum der Mastzellen sind ihre zahlreichen zytoplasmatischen Granula, die verschiedene vasoaktive und chemotaktische Mediatoren (z.B. Histamin, Leukotriene), proteolytische Enzyme und Proteoglykane enthalten. Nach Stimulation werden diese aus den Granula freigesetzt (Degranulation). Bei der am besten untersuchten IgE-vermittelten Degranulation binden Mastzellen über hochaffine Rezeptoren auf ihrer Oberfläche IgE-Moleküle. Quervernetzung dieser Komplexe durch Allergene oder Anti-IgE-Antikörper führt zu einer augenblicklichen Freisetzung der in den Granula gespeicherten Entzündungsmediatoren, die eine anaphylaktische Reaktion vom Soforttyp (Typ-I-Reaktion) auslösen mit erhöhter Gefäßpermeabilität und Ödemen (Urtikaria oder Angioödem). Daneben spielen Mastzellen auch bei Immunreaktionen vom verzögerten Typ (Typ-IV-Reaktionen) eine Rolle.

Die **Blutversorgung der Dermis** erfolgt über zwei Gefäßnetze. Die in den subkutanen Bindegewebesebenen verlaufenden Arterien und Venen bilden in der unteren Dermis einen tiefen Plexus. Von diesem steigen Arteriolen und Venolen zu einem in der obersten Schicht des Stratum reticulare gelegenen zweiten Gefäßnetz, dem oberflächlichen Plexus, auf, der die Papillarschicht mit Kapillaren versorgt. Von hier aus erfolgt der Stoffaustausch mit der Epidermis durch Diffusion. Die Kontinuität der Endothelauskleidung ist in den Kapillaren der

dermalen Papillen und Haarfollikel durch Spalträume (Endothelfenster) unterbrochen. Dadurch wird ein rascher Austausch von Zellen und Molekülen ermöglicht. Die Endothelzellen synthetisieren ihrerseits eine Vielzahl von immunmodulierenden Mediatoren, die eine Adhäsion und Aktivierung von Immunzellen, die Blutgerinnung und den Gefäßtonus steuern. In der Frühphase einer Entzündung kommt es als Folge einer erhöhten Endothelpermeabilität zum Plasmaaustritt (Ödem, s.o.). Später werden die Endothelzellen aktiviert und bereiten die nachfolgende Immunantwort vor, indem sie T-Zell-aktivierende Zytokine sezernieren und Oberflächenmoleküle (z.B. MHC-Klasse-I, -II- und Adhäsionsmoleküle) exprimieren, welche die Anheftung und Aktivierung von Immunzellen und deren Auswanderung in das Gewebe steuern.

2.2 Wechselwirkungen zwischen Haut, Arzneistoff und Vehikel

Mit der epikutanen Applikation, die den großen Vorteil hat, dass der Wirkstoff nichtinvasiv zugeführt wird, können prinzipiell unterschiedliche Ziele verfolgt werden,

- a) auf die Hautoberfläche oder obere Hornschicht begrenzte Effekte, z.B. mit Hautantiseptika, Antiparasitika, Repellentien und UV-Schutzmittel,
- b) die Behandlung von Hauterkrankungen,
- c) lokale Wirkungen in tieferen Geweben, z.B. an Muskeln, gelenknahen Weichteilen (Schleimbeutel, Sehnen, Sehnenscheiden, Bänder, Gelenkkapseln) und peripheren Venen oder
- d) systemische Wirkungen durch den Einsatz von transdermalen therapeutischen Systemen (TTS) oder Iontophorese und Phonophorese.

Unter Berücksichtigung dieser Zielstellungen hängt die Effektivität maßgeblich von drei Faktoren ab,

- von den Eigenschaften des Wirkstoffs,
- von den Eigenschaften des Vehikels und
- vom Zustand der Haut,

die sich gegenseitig beeinflussen können und stets im Zusammenhang zu betrachten sind.

Während bei angestrebten Effekten auf der Hautoberfläche eine Fixierung der Wirkstoffe auf bzw. in der oberen Hornschicht und eine geringe Penetration der Hornschichtbarriere erwünscht ist, sollte bei Topika zur Behandlung von Hauterkrankungen, die meist in den lebenden Schichten der Epidermis und in der oberen Dermis lokalisiert sind, eine therapiegerechte Wirkstoffverfügbarkeit in diesen Bereichen gewährleistet sein. Dementsprechend sollte dabei im Idealfall die Penetration so gesteuert werden, dass ausreichende Arzneistoffkonzentrationen am Wirkort erzielt werden, der Übergang in die gefäßtragenden Teile der Dermis jedoch langsam genug erfolgt, um unerwünschte systemische Wirkungen zu vermeiden. Demgegenüber ist bei beabsichtigter systemischer Wirkung eine möglichst schnelle und vollständige Permeation des Wirkstoffs durch die Haut und eine Resorption über die Kapillarnetze der Dermis erwünscht, die zu wirksamen Plasmakonzentrationen führt.

Arzneistoffe, die eine topische Wirkung in der Dermis oder tiefer entfalten sollen, müssen dagegen zusätzlich das engmaschige Netz der Kapillargefäße der Papillarschicht passieren. Hier ist der Übergang eines Teils des Arzneistoffs in die Blutbahn nicht zu vermeiden. Falls dabei unerwünschte systemische Wirkungen ausbleiben, ist das vor allem darauf zurückzuführen, dass der absorbierte Anteil aufgrund seiner Verteilung im Organismus so stark verdünnt wird, dass häufig nur geringe Plasmaspiegel resultieren und durch schnelle systemische Elimination eine Kumulation verhindert wird. Zufriedenstellende topische Wirkungen in tieferen Bereichen können unter diesen Bedingungen über einen längeren Zeitraum nur bei ausreichender und nachhaltiger Hautpermeation, unterstützt durch geeignete Vehikel, erzielt werden. Andererseits dürfte bei Verletzungs- bzw. entzündungsbedingten lokalen Störungen der Mikrozirkulation ein Übergang in tiefere Gewebebereiche begünstigt sein.

Entscheidend für die biologische Verfügbarkeit epikutan applizierter Wirkstoffe sind in allen Fällen die Diffusions- und Verteilungsprozesse, die den Transport in und durch das SC sowie den Übergang in die lebenden Schichten der Epidermis bestimmen (vgl. Abb. 6).

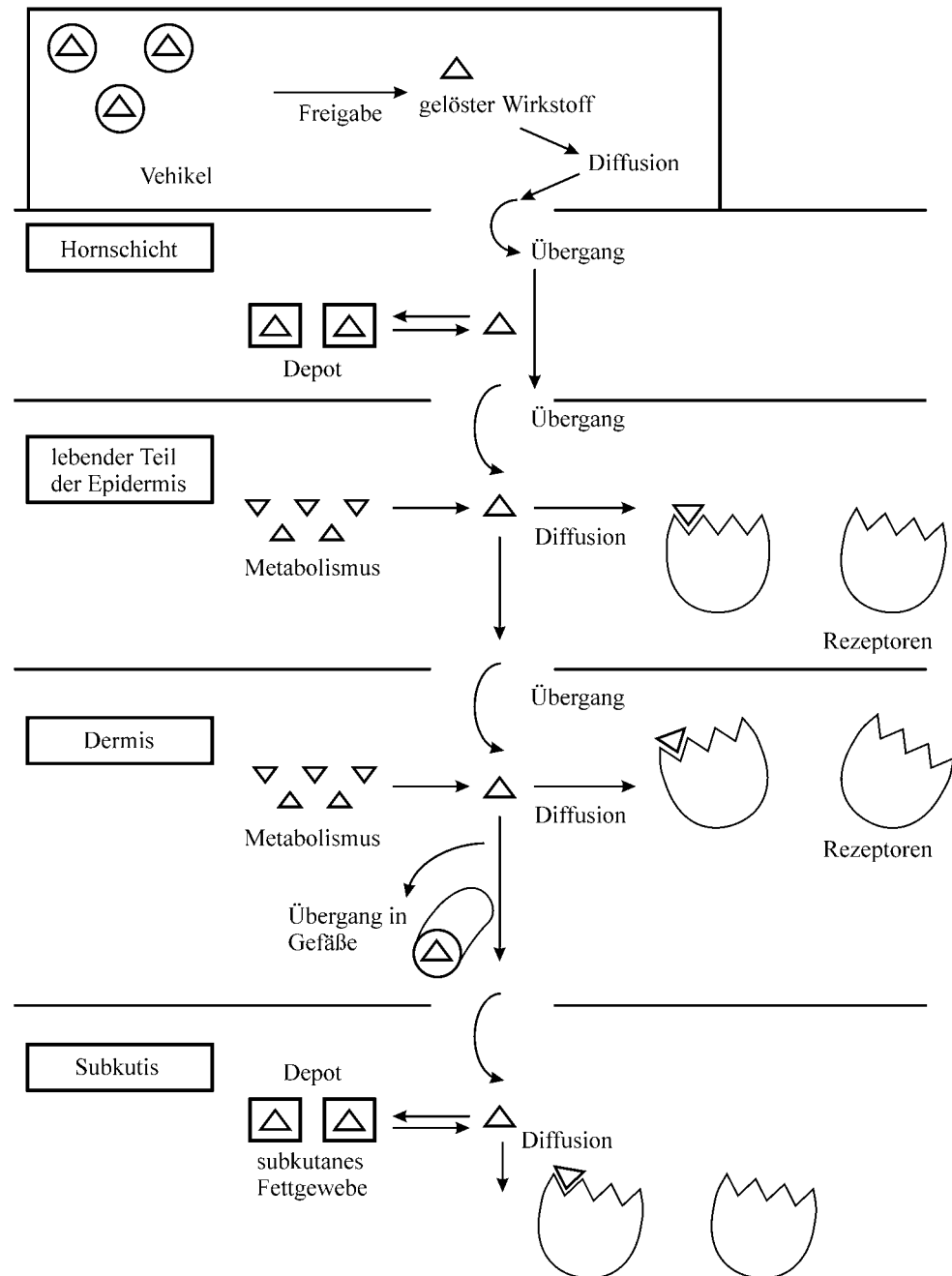


Abb. 6 Schematische Darstellung der Prozesse nach perkutaner Applikation einer Wirkstoffzubereitung (modifiziert nach [92])

2.2.1 Eigenschaften des Wirkstoffs

Der erste Schritt nach epikutaner Applikation einer Wirkstoffzubereitung ist die Freigabe aus dem Vehikel, welche im Falle einer Wirkstoffsuspension den Übertritt einzelner Wirkstoffmoleküle aus der Grenzfläche Feststoff/Trägergrundlage in die nähere Umgebung (Auflösung

des Wirkstoffs) einschließt, gefolgt von der Diffusion zur Grenzfläche Vehikel/Hornschicht (SC). Daran schließen sich die Verteilung des Wirkstoffs zwischen Vehikel und oberer Grenzphase des SC sowie seine Diffusion in die Hornschicht (Penetration) an. Letztere erfolgt bevorzugt lateral durch die lipophilen Regionen der SC-Lipidbilayer (siehe 2.1.2.) und stellt in der Regel den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt des gesamten Folgeprozesses dar. Während die Penetration des SC durch die Lipophilie des Wirkstoffs begünstigt wird, setzt die nachfolgende Verteilung zwischen den apolaren Regionen der interzellulären SC-Lipide und dem lebenden Teil der Epidermis, der einen stärker hydrophilen Charakter aufweist, eine gewisse Hydrophilie des Wirkstoffs voraus. Ist diese zu gering, kann es im SC zum Wirkstoffstau und damit zur Depotbildung kommen.

Nach Erreichen des lebenden Teils der Epidermis diffundiert der Wirkstoff relativ schnell bis in die Dermis. Hier wird der überwiegende Teil über die Gefäße des Lymph- und Kapillarnetzes resorbiert. Der nichtresorbierte Rest diffundiert in tiefere Gewebereiche und kann insbesondere bei hoher Lipophilie teilweise im subkutanen Fettgewebe gespeichert werden (s. Abb. 6).

Sowohl in der lebenden Epidermis als auch in der Dermis können Wirkstoffe z.T. metabolisiert werden und mit Rezeptoren in Wechselwirkung treten.

Biotransformation. Zum Wirkstoffmetabolismus in der Haut durch Biotransformationsenzyme der Hautzellen und residenten Mikroorganismen liegt eine Reihe von Übersichten vor (vgl. [102 – 105]).

Die an verschiedenen Spezies gewonnenen Ergebnisse weisen Ähnlichkeiten sowie qualitative und vor allem quantitative Unterschiede in der Expression von Biotransformationsenzymen zwischen Haut und Leber aus. Bemerkenswert ist die hohe **NAD(P)H-Chinon-Reduktase**-Aktivität in der Haut. Während dieses zytoprotektive Enzym in der Haut annähernd gleiche Aktivitätswerte wie in der Leber zeigt, betragen die **Cytochrom P-450**- und **Glucuronyltransferase**-Aktivitäten in der Haut nur 1 – 5 % bzw. 10 % der Leberwerte (bei z.T. starken Unterschieden im Isoenzymmuster). Im Hinblick auf die topische Therapie mit Ester-Prodrugs der Corticosteroide ist die relativ schnelle Hydrolyse

der 21-Monoester in Abhängigkeit von der Länge ihrer Seitenkette durch hauteigene **Esterasen** zu beachten [106], während bei den weitgehend hydrolyseresistenten 17-Monoestern erst eine langsame nichtenzymatische Umwandlung zu den 21-Monoestern erfolgt. Der gut penetrierende und wirksame Fluocortinbutylester ist dagegen ein Beispiel für ein topisches „Softdrug“. Der Ester wird bereits in der Haut zur inaktiven Corticoid-Säure gespalten. Dieses Softdrug besitzt zwar eine geringere Wirksamkeit, stellt aber eine nebenwirkungsärmere Therapiemöglichkeit bei Problempatienten dar.

Einen interessanten Ansatzpunkt für die Entwicklung von Prodrugs mit einer targetorientierten Bioaktivierung liefert u.a. das in neutrophilen Granulozyten exprimierte Enzym **Elastase**. Die Elastase zeigt in Entzündungsherden der Haut eine um ein Vielfaches erhöhte Aktivität [107], so dass bei Einsatz von Corticosteroid-Peptidkonjugaten, die spezifisch durch dieses Enzym gespalten und in die Wirkform überführt werden, eine Aktivierung direkt am Wirkort erzielt werden könnte.

Zu beachten ist schließlich auch, dass die Haut über ein komplexes System von nicht-enzymatischen und enzymatischen Komponenten zur Reduktion freier Radikale unter maßgeblicher Beteiligung des Systems **Thioredoxin-Thioredoxin-Reduktase** verfügt [27, 108 - 111].

Aus diesen kurzen Bemerkungen wird deutlich, dass neben den für die Hautpermeation maßgeblichen physikalisch-chemischen Eigenschaften des Wirkstoffs auch seine Biotransformation in der Haut die Bioverfügbarkeit nach perkutaner Applikation beeinflussen kann.

Transdermale therapeutische Systeme. Die Entwicklung transdermaler therapeutischer Systeme (TTS) mit kontrollierter Freigabe ist in der Regel für die Arzneistoffe sinnvoll, deren physikalisch-chemische Eigenschaften eine relativ schnelle Permeation durch die Epidermis ermöglichen und die eine ausreichende biochemische Stabilität in der Haut besitzen. Die relative Molekülmasse sollte unter 1000, besser unter 500 liegen, der n-Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizient zwischen 1 und 100 und das Molekül sollte zwar eine gewisse Hydrophilie aber keine ausgeprägten polaren Zentren besitzen (s.o.).

Sind die Voraussetzungen für eine gute Permeation der Epidermis erfüllt, so ist durch Membran- oder Matrixkontrolle über einen definierten Zeitraum eine gesteuerte Freigabe des Arzneistoffs aus dem TTS möglich, da diese zum geschwindigkeitsbestimmenden Schritt des komplexen Folgeprozesses wird. In einigen Fällen baut sich allerdings wegen zu geringer Hydrophilie ein Depot im SC auf (s.o.), aus dem der Wirkstoff kontinuierlich in die tieferen Hautschichten abgegeben wird (z.B. Fentanyl und Norethisteronacetat). Weiterhin ist bei der Konzipierung eines TTS zu beachten, dass die Eliminationshalbwertszeit des Arzneistoffs 6 - 8 Stunden nicht überschreiten sollte, die erforderliche Tagesdosis möglichst weniger als 1,5 mg beträgt und als besondere Vorteile die Vermeidung eines starken First-pass-Metabolismus, Verbesserungen der Verträglichkeit und Compliance sowie eine Erleichterung der Behandlung (z.B. Vermeidung von Injektionen) die Entwicklung rechtfertigen.

Derzeit in zugelassenen TTS (Membran- und/oder Matrixpflaster) eingesetzte Wirkstoffe sind Estradiol allein und in Kombination mit dem Gestagen Norethisteronacetat sowie Testosteron zur Hormonsubstitution, Glyceroltrinitrat zur Behandlung von Angina pectoris, Clonidin als Antihypertonikum (in den USA zugelassenes TTS), Fentanyl zur Behandlung stärkster Schmerzen vorzugsweise bei Krebspatienten, die nichtsteroidalen Antiphlogistika Flurbiprofen (in Südafrika zugelassenes TTS) sowie Diclofenac (in der Schweiz zugelassenes TTS), Nicotin zur Unterstützung der Raucherentwöhnung und L-Hyoscin (Scopolamin) zur Vorbeugung von Reisekrankheiten. Neben dem Fentanyl-TTS, dessen Einführung aufgrund der Vermeidung einer Belastung des Gastrointestinaltraktes und der guten Handhabbarkeit durch den Patienten (Umgehung von Injektionen) einen bemerkenswerten therapeutischen Fortschritt bedeutete, ist in Kürze mit Buprenorphin, dessen Bioverfügbarkeit nach peroraler Applikation schlecht ist, die Zulassung eines weiteren Opioids als TTS zur Behandlung starker chronischer Schmerzen zu erwarten. Für eine Reihe anderer Wirksubstanzen sind TTS in der Entwicklung bzw. klinischen Prüfung. Darunter befinden sich TTS mit Propranolol und Mepindolol zur Blutdrucksenkung, mit Estradiol und Levonorgestrel zur Kontrazeption, mit dem nichtsteroidalen Antiphlogistikum Ketoprofen, dem Cytostatikum 5-Fluorouracil, mit Physostigmin oder dem Dopamin D₂-Antagonisten N-0923 als Mittel gegen Morbus Parkinson und sogar mit Insulin sowie anderen Peptiden (z.B. Leuprolid, Enkephalin, Oxytocin).

Die Entwicklung von TTS für Peptide konzentriert sich z.T. auf **stromkontrollierte Freigabesysteme** und bezieht die Verwendung von Penetrations-Enhancern ein (s.u., [95 - 98]). Eine Minimierung von Irritationen und Schäden kann dabei durch Verwendung kurzer Gleichstrom-Pulse (10^{-4} bis 10^{-5} s) erzielt werden, die wässrige Poren innerhalb der multiplen Lipid-Doppelschichten des Stratum corneum erzeugen (**Elektroporation**). Durch diese Poren wird ein elektrophoretisch und/oder elektroosmotisch getriebener Transport größerer Moleküle ermöglicht.

Eine weitere seit einigen Jahren experimentell untersuchte physikalische Methode zur Steigerung des Wirkstofftransports durch die Haut ist die **Phonophorese** [99 - 101]. Diese beinhaltet die Anwendung von Ultraschall in einem Frequenzbereich von 20 kHz bis 3,6 MHz und einer Leistung zwischen 0,15 bis 4 W/cm², die zu einer bis zu zwanzigfachen Erhöhung des Wirkstoffdurchtritts führte. Neben einer Erwärmung der Haut, die infolge der Temperaturabhängigkeit der Diffusionskoeffizienten permeationssteigernd wirkt, wird eine Beeinflussung der Lipid-Doppelschichten durch die Schallwellen postuliert. Allerdings ist die Wirkung von Ultraschall auf die Haut noch nicht restlos geklärt. Auch eine abschließende Bewertung dieser Methode ist bisher noch nicht möglich.

2.2.2 Penetrationsenhancer

Eine Vielzahl von Wirkstoffen kann das SC nicht oder nur in geringem Ausmaß durchdringen. Für diese Stoffe wird nach Möglichkeiten gesucht, die epidermale Permeation (insbesondere die Penetration des SC) zu verbessern. Dies kann prinzipiell auf chemischem Weg durch die Entwicklung von Prodrugs mit verbessertem Penetrations- und/oder Permeationsvermögen oder den Einsatz von Enhancern sowie mit physikalischen Verfahren wie Elektro- und Phonophorese erreicht werden (s.o.).

Enhancer der Hautpenetration oder -permeation sind Bestandteile der Formulierung, die in die Haut diffundieren und den Diffusionswiderstand des SC reversibel herabsetzen und/oder über die Beeinflussung der Löslichkeit sowie der Verteilungskoeffizienten an den Grenzen des SC die Penetration oder Permeation des Wirkstoffs verbessern.

Ihr Effekt beruht also auf Änderungen des Zustandes der Hornschicht. Dabei spielen Wechselwirkungen mit den Lipiddomänen und den Proteinkomponenten des SC eine wichtige Rolle.

Ein idealer Enhancer sollte folgende Anforderungen erfüllen:

- pharmakologisch-toxikologische Unbedenklichkeit (GRAS-Status = generally recognized as safe) incl. Fehlen einer Irritation und Sensibilisierung der Haut,
- reversible Modifikation der Barrierefunktion der Haut (schnelle und vollständige Regeneration nach Applikationsende),
- keine Inkompatibilitäten mit den Wirk- und Hilfsstoffen der Formulierung,
- hohe chemische Stabilität.

Der Umfang der Originalpublikationen, die sich mit der Verbesserung der Hautpenetration befassen, und die Zahl der als Enhancer beschriebenen Substanzen ist beachtlich (vgl. aktuelle Zusammenstellung von über 400 Beiträgen, incl. Patentliteratur, mit mehr als 275 chemischen Substanzen, die als Enhancer beschrieben werden [112]). Diese Substanzen erfüllen die genannten Kriterien meist nicht oder nur annähernd, wobei vor allem konzentrationsabhängige graduelle Schädigungen der Barrierefunktion zu beachten sind. Hier soll auf eine Reihe kritischer Übersichten hingewiesen werden [112 - 118].

Irreversible Schädigungen der Hautbarriere gehen meist von niedermolekularen, niedrigviskosen, flüchtigen Lösungsmitteln aus (Aceton, Chloroform, Ether, Hexan). Ein besonders hohes Schädigungspotential besitzen Mischungen von unpolaren und polaren Lösungsmitteln (z.B. Chloroform/Methanol 2 : 1 und Ether/Ethanol 10 : 1), die aufgrund einer Delipidisierung der Hornschicht eine annähernd poröse, nichtselektive Membran entstehen lassen.

Eine klare Abgrenzung zwischen echten Enhancereffekten auf die Permeationsbarriere und einer Verbesserung der Freisetzung des Wirkstoffs aus dem Vehikel ist häufig problematisch. So soll z.B. Propylenglycol einerseits als Enhancer wirken (s.u.), verbessert aber auch durch Beeinflussung der thermodynamischen Aktivität der Wirkstoffe (z.B. Steroide) im Vehikel deren Freigabe und verstärkt als Kosolvens die Steigerung der Wirkstoffpermeation durch andere Enhancer (z.B. Laurocapram, Terpene, Ölsäure), indem deren Konzentration im SC

erhöht wird. Auch in anderen Fällen beschränkt sich der Effekt von Enhancern nicht ausschließlich auf die Veränderung der Barrierefunktion.

Enhancer lassen sich verschiedenen chemischen Substanzklassen zuordnen. Beispiele sind einwertige und mehrwertige Alkohole (Ethanol, Glycerol, Propylenglycol, Fettalkohole wie Laurylalkohol), Fettsäuren (Ölsäure, Laurinsäure), Fettsäureester, Sulfoxid-Derivate (Dimethylsulfoxid = DMSO, Decylmethylsulfoxid = Decyl-MSO), 1-Dodecylazacycloheptan-2-on (Laurocapram, Azone[®]) und Derivate, Harnstoff und Derivate (darunter 1-Dodecyl- und 1,3-Didodecylharnstoff sowie zyklische, biologisch abbaubare Harnstoffderivate), Pyrrolidone (2-Pyrrolidon, N-Methyl-2-pyrrolidon, 2-Pyrrolidon-5-carbonsäure u.a.), Terpene (1,8-Cineol, Limonenoxid, Menthon, α -Terpinol, Carvol u.a.) und Tenside.

Die Mechanismen, die den Enhancerwirkungen zugrunde liegen sind vielfältig und noch nicht in allen Einzelheiten geklärt. Eine wichtige Rolle spielen Veränderungen im kolloid-kristallinen Zustand der SC-Lipide, verbunden mit einer Störung der kristallinen Struktur, die eine erhöhte Fluidität, geringere intermolekulare Wechselwirkungen und damit eine Abnahme des Diffusionswiderstandes für den Wirkstoff zur Folge hat.

Lipophile Enhancer können sich zwischen die parallel angeordneten Lipidketten der interzellulären Doppelschichten schieben und die strukturelle Ordnung auf der apolaren Ebene, verbunden mit einer Verringerung der intermolekularen Wechselwirkungen und der Packungsdichte ändern, so dass die Penetration lipophiler Wirkstoffe erleichtert wird. Diese Störung kann sich ihrerseits auf die Ordnung im Bereich der polaren Kopfgruppen der Lipidbilayer auswirken, so dass auch die Penetration über den polaren Weg verbessert wird.

Andererseits können viele Enhancer aufgrund ihrer Molekülstruktur und Ladungsdichte mit den polaren Kopfgruppen der Wasser-Lipid-Doppelschichten reagieren. Dies führt zu einer Störung der Hydratationssphäre der Kopfgruppen und ihrer Wechselwirkungen. Das Volumen an nicht gebundenem Wasser und die Fluidität dieser Region nehmen zu und es kommt zu einer Verbesserung der Penetration hydrophiler Wirkstoffe über den polaren Weg. Störungen im polaren Bereich können sich in diesem Fall auf den Ordnungszustand der Lipidketten im

Inneren der Bilayer auswirken, so dass gleichzeitig der Diffusionswiderstand für lipophile Substanzen über den apolaren Weg verringert wird.

Bei höheren Konzentrationen bestimmter Enhancer im SC ist eine Veränderung der Verteilungskoeffizienten an dessen Grenzflächen zum Vehikel und zum lebenden Teil der Epidermis zu erwarten.

Einer der effektivsten und sichersten Penetrationsvermittler ist zweifellos **Wasser**. Mit der allgemeinen Hydratation des SC steigt auch die Penetration der meisten Wirkstoffe an. Die Hydratation der Hornschicht wird u.a. von den als **Natural Moisturizing Factor** (NMF; siehe 2.1.) bezeichneten Substanzen beeinflusst und kann durch die Verwendung von NMF-Komponenten (z.B. Natrium-2-pyrrolidon-5-carboxylat und Harnstoff) und davon abgeleiteten Derivaten als Enhancer sowie durch Okklusion (s.2.2.3.) gesteigert werden. Harnstoff und seine Derivate sollen auch mit polaren Kopfgruppen von Keratinen in Wechselwirkung treten und milde keratolytische Effekte in der Hornschicht bewirken. DSC-Untersuchungen liefern außerdem Hinweise auf eine Erhöhung der Fluidität der Lipidregionen des SC.

Als Enhancer genutzte **Pyrrolidone** sind vor allem 2-Pyrrolidon, N-Methyl-2-pyrrolidon und 2-Pyrrolidon-5-carbonsäure und biologisch abbaubare Pyrrolidone wie N-(2-Hydroxyethyl)-2-pyrrolidon und dessen Fettsäureester. Sie führen zu Penetrationsstörungen über den polaren und unpolaren Weg, wobei 2-Pyrrolidon primär auf den polaren Weg wirken soll und der starke Enhancereffekt von lipophilen Pyrrolidonen auf Wechselwirkungen mit Lipidketten des SC zurückgeführt wird.

Für den Enhancereffekt von **DMSO** werden vor allem zwei Mechanismen verantwortlich gemacht. DMSO führt im SC zu lösungsmittelgefüllten Räumen mit einer verbesserten Löslichkeit für den Wirkstoff aufgrund seiner ausgezeichneten Solvatationseigenschaften. In Konzentrationen über 60 % löst es die Ordnung der Barrierelipide auf.

DMSO verdrängt Wasser an den polaren Kopfgruppen der Lipiddoppelschichten und führt zwischen diesen zur Ausbildung von Kanälen. Daneben kommt es zu einer Störung der

geordneten Struktur der Lipidketten im Inneren der Bilayer, verbunden mit einer Erhöhung der Fluidität und einer Abnahme des Diffusionswiderstandes in diesem Bereich. Decyl-MSO wirkt in niedrigeren Konzentrationen als DMSO und fördert die Penetration polarer Wirkstoffe stärker als den Transport apolarer Substanzen.

Besondere Beachtung als Enhancer hat **Laurocapram** (Azone[®]) gefunden. Hierbei handelt es sich um ein ausgezeichnetes Lösungsmittel für zahlreiche Wirkstoffe und einen effektiven Penetrationsvermittler, dessen Enhancereffekt nach thermoanalytischen Untersuchungen (DSC) vor allem auf Wechselwirkungen mit den apolaren Regionen der interzellulären Lipidbilayer beruht, die zu einer Erhöhung der Fluidität in diesem Bereich führen. Der Effekt nach einmaliger perkutaner Applikation einer Zubereitung mit einem Anteil von 3 – 5 % Laurocapram hält bis zu 5 Tage an und kann durch Kosolventien wie z.B. Propylenglycol gesteigert werden. Demnach verbleibt dieser Enhancer vornehmlich im SC und zeigt eine geringe Tendenz, in den hydrophilen lebenden Teil der Epidermis überzutreten. Es wird diskutiert, dass aufgrund der den Dimensionen des Cholesterolskeletts entsprechenden Dodecylkette von Laurocapram durch Einbau des Moleküls in die Lipidbilayer des SC die Cholesterol-Ceramid- und Cholesterol-Cholesterol-Wechselwirkungen verringert werden.

Bestimmte **Terpene** wie α -Pinen, D-Limonen, 3-Caren, Ascaridol, 7-Oxabicyclo-(2,2,1)-heptan und 1,8-Cineol sind als gute reversible Penetrationsenhancer erkannt worden, die vor allem durch Wechselwirkungen mit den interzellulären Lipidstrukturen den unpolaren Weg beeinflussen. Auch im Fall der Terpene konnte ein synergistischer Effekt von Kosolventien wie Propylenglycol und Ethanol festgestellt werden.

Auf die Problematik der Abgrenzung einer eventuell eigenen Enhancerwirkung von Effekten auf den Übergang des Wirkstoffs aus dem Vehikel in das SC bzw. auf den Synergismus mit den anderen Enhancern im Fall der **ein- und mehrwertigen Alkohole**, insbesondere der in der Dermatologie am häufigsten eingesetzten Kosolventien **Propylenglycol** und **Glycerin** wurde bereits hingewiesen. Obwohl z.T. widersprüchliche Befunde vorliegen, wird die Möglichkeit von Wechselwirkungen zwischen Propylenglycol und den polaren Kopfgruppen der SC-Lipide diskutiert.

Die Steigerung der Penetration hydrophober Wirkstoffe durch **Ethanol** wird auf dessen Eindringen in die Lipidbereiche des SC und die dadurch verbesserte Löslichkeit der Wirksubstanzen in dieser Region zurückgeführt.

Fettalkohole verstärken dagegen die Penetration lipophiler Stoffe über den unpolaren Weg durch Wechselwirkungen mit den SC-Lipiden unter Verringerung des Diffusionswiderstandes.

Gegenüber Fettalkoholen ergibt sich bei Verwendung von **langkettigen Fettsäuren** in Kombination mit Kosolventien ein stärkerer Enhancereffekt und eine vergleichbare Abhängigkeit von der Kettenlänge mit einem Maximum zwischen Nonansäure (= Pelargonsäure) und Dodecansäure (= Laurinsäure) bei den gesättigten Fettsäuren sowie einer Steigerung des Effekts bei einfach ungesättigten Fettsäuren von cis- α -Octadecensäure (= Ölsäure) bis zur cis-9-Tetradecensäure (= Myristoleinsäure). Ungesättigte Fettsäuren sind wirksamer als gesättigte Fettsäuren gleicher Länge. Bei gleicher Kettenlänge steigt die Effektivität mit zunehmender Zahl an cis-Doppelbindungen. Cis-Isomere sind wirksamer als trans-Isomere, da sie eine Kinke im Molekül aufweisen. Diese bedingt bei Einbau der Fettsäure in die SC-Lipiddoppelschichten eine stärkere Störung des Ordnungszustandes.

Alkyl- und Fettsäureester zeigen ebenfalls Enhancereffekte. Dazu gehören u.a. Vehikelbestandteile wie Isopropylmyristat oder Triglyceride, die in das SC diffundieren, den Ordnungszustand der Lipiddoppelschichten beeinflussen und den Diffusionswiderstand verringern können (s.u.).

Tenside werden in dermatologischen und kosmetischen Zubereitungen in der Regel als Emulgatoren eingesetzt, deren Aufgabe es ist, Lipide durch die Bildung von mizellaren Strukturen in Wasser zu dispergieren. Sie sind andererseits prinzipiell in der Lage die kontinuierlichen Lipid-Doppelschichtstrukturen des SC zu unterbrechen und damit die Permeabilitätsbarriere zu stören (vgl. Abb. 7).

Als Folge einer Schädigung der Permeabilitätsbarriere durch Tenside steigt der transepidermale Wasserverlust (TEWL) und wird die Syntheserate von Lipiden und Zytokinen erhöht

[121 - 123]. Äußerlich resultiert eine durch Erythembildung und Hautschuppung gekennzeichnete Hautirritation. Die mizellierende Wirkung auf die Lipid-Doppelschichten des SC hängt vom mengenmäßigen Verhältnis von Lipid und Emulgator in der Zubereitung und von der Struktur des Emulgators ab. Die Menge des Emulgators sollte insbesondere in Kosmetika aufgrund ihrer großflächigen und unkontrollierten Anwendung möglichst klein sein. Bei der Auswahl ist zu beachten, dass Emulgatoren, die eine ähnliche Struktur besitzen wie die Barrierelipide, die Doppelschichten von SC-Lipiden weniger stark beeinflussen und ein geringeres Hautirritationspotenzial zeigen [120, 124]. So kommt es z.B. im Vergleich zu einem nichtionischen, ethoxylierten Tensid bei Dodecylbetain erst in sehr viel höheren Konzentrationen zu einer Zerstörung der kontinuierlichen Doppelmembranen von Hautlipiden [124]. Dies lässt sich dadurch erklären, dass Dodecylbetain die gleiche hydrophile Kopfgruppe besitzt wie Phosphatidylcholin, das wichtigste Doppelmembranen bildende Biomolekül. Dodecylbetain wird somit wie der natürliche Emulgator Phosphatidylcholin in die Doppelmembran integriert, statt diese zu mizellieren.

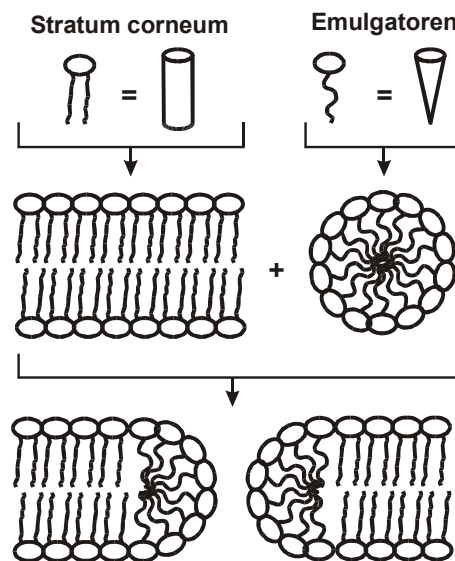


Abb. 7 Wechselwirkungen kristalliner Doppelmembranen mit Emulgatoren in Wasser (nach [120])

In Bezug auf den Wirkstofftransport nach perkutaner Applikation sind in Abhängigkeit von der **Tensidkonzentration** unterschiedliche Effekte zu beachten. Bei niedrigen Tensidkonzentrationen kommt es zunächst zu einer Steigerung der Wirkstoffpenetration, die darauf zurückgeführt wird, dass Tensidmoleküle als Monomere oder Dimere in das SC übergehen und hier

mit den Lipid-Doppelschichtstrukturen in Wechselwirkung treten. Oberhalb der kritischen Mizellkonzentration (CMC) wird dagegen die thermodynamische Aktivität des Wirkstoffs im Vehikel durch Solubilisierung und Einbau in die Molekülassoziate reduziert und sein Übergang in das SC verlangsamt.

Der für die Wechselwirkungen mit den Barrierelipiden notwendige Übergang des Tensids in das SC hängt vom thermodynamischen Gleichgewicht zwischen den Mizellen und den einzelnen Tensidmolekülen sowie von den Verteilungsbedingungen an der Grenzfläche Vehikel/SC ab.

Die penetrationsfördernde Wirkung nimmt in der Reihenfolge nichtionische, kationische, anionische Tenside zu.

Anionische Tenside wie Natriumdodecylsulfat und andere Alkylsulfate führen im Gegensatz zu kationischen und nichtionischen Tensiden zu einem Aufquellen der Hornschicht. Daraus kann abgeleitet werden, dass neben den Wechselwirkungen mit den kristallinen Lipid-Doppelmembranen (s.o.) eine Hydratation des SC an der penetrationssteigernden Wirkung beteiligt ist. Als Ursache für die gesteigerte Hydratation wird die Fähigkeit der anionischen Tenside angesehen, an epidermale Proteine zu binden und durch Wechselwirkungen deren Konformation so zu ändern, dass eine Zunahme wasserbindender Stellen resultiert. In Abhängigkeit von der Tensidkonzentration im SC werden reversible Störungen der Barrierestrukturen und Hautirritationen induziert.

Kationische Tenside wie Cetylammoniumbromid (CTAB) und andere Alkylammoniumbromide können ebenfalls an epidermales Protein gebunden werden, bewirken aber kein Anschwellen der Hornschicht. Sie werden im Vergleich zu den anionischen Tensiden als noch hautschädigender eingestuft und daher kaum als Penetrationsvermittler angewendet. Langkettige Alkylamine, die weit weniger hautirritierend wirken als CTAB, sollen bei dem schwach sauren pH-Wert der Hornschichtoberfläche protoniert werden und mit Wirkstoffanionen Ionenpaare bilden, die in tiefere Schichten der SC-Barriere diffundieren können. Hier wird aufgrund des höheren pH-Wertes das Amin deprotoniert und das Wirkstoffanion freigegeben.

Nichtionische Tenside haben zwar das geringste Hautirritationspotenzial, aber auch deutlich geringere penetrationsvermittelnde Wirkungen als die ionischen Tenside. Häufig verwendete nichtionische Tenside enthalten Polyoxyethylengruppen als hydrophile Komponenten und stammen aus der Reihe der Polysorbate, der Fettalkoholether oder Alkylester, der Alkylphenole und Poloxamere mit einer Polypropylenkette als lipophilem Anteil. Die penetrationsfördernde Wirkung beruht vorwiegend auf Wechselwirkungen mit den Barrierelipiden. Dabei dürfte es in Abhängigkeit von der Konzentration im SC und der Struktur des Tensids (s.o.) zu einer Integration und Erhöhung der Fluidität oder Mizellierung der Doppelmembranen kommen. Bei den ethoxylierten Tensiden sind Verbindungen mit unverzweigten C10- oder C12-Alkylketten und einem aus maximal fünf Ethylenoxideinheiten bestehenden polaren Kopf besonders effektiv. Der Effekt kann mit Lösungsmitteln wie Propylenglycol gesteigert werden. Die weitgehende Unwirksamkeit von Tensiden mit verzweigten Ketten oder aromatischen Gruppen wird darauf zurückgeführt, dass diese nicht oder nur sehr langsam in die Lipidstrukturen eindringen können. Als weiterer möglicher Wirkungsmechanismus ist auch eine Bindung an Keratinfilamente gefolgt von Wechselwirkungen, die zu einem erleichterten Wirkstofftransport innerhalb der Korneozyten führen sollen, diskutiert worden.

2.2.3 Einfluss des Vehikels

Bei der Anwendung von **transdermalen therapeutischen Systemen** steht das Ziel einer kontinuierlichen, gesteuerten Arzneistoffinvasion, ähnlich einer Dauerinfusion, verbunden mit einer Reihe von pharmakokinetischen und therapeutischen Vorzügen im Vordergrund (s.o.). Demgegenüber besteht der Vorteil der **topischen Pharmakotherapie** vor allem darin, dass über einen längeren Zeitraum wirksame Konzentrationen des Arzneistoffs am Wirkort bei einer vergleichsweise geringen systemischen Belastung erzielt werden können. Besonders gravierend ist dieser Gesichtspunkt bei der Behandlung von Erkrankungen im Bereich der Epidermis. Diese besitzt keine Blutgefäße und wird ausgehend vom oberen Gefäßnetz der Papillarschicht durch Diffusion versorgt. Bei systemischer Behandlung würde man daher wegen der Verteilung sowie der gleichzeitig einsetzenden hepatischen Biotransformation und Exkretion eine relativ hohe Dosis benötigen, um effektive Wirkstoffkonzentrationen in der Epidermis zu erzielen, verbunden mit der Gefahr unerwünschter Wirkungen durch hohe

Plasmaspiegel. Aber auch bei Erkrankungen in tieferen Hautschichten und hautnahen Bereichen kann die topische Behandlung u. U. pharmakokinetisch vorteilhaft sein.

Auswahl geeigneter Vehikel. Die Wahl des Vehikels richtet sich nach dem Wirkort, den physikalisch-chemischen Eigenschaften des Wirkstoffs und dem Zustand der Haut. Die Wirkung von Dermatika hängt in besonderem Maße von den Eigenschaften der Zubereitung ab. Häufig lässt sich der Hautzustand bereits ohne spezielle Wirkstoffe durch die Eigenschaft einer adäquaten Grundlage positiv beeinflussen.

In diesem Zusammenhang gelten in der Dermatologie einige allgemeine **Therapieregeln** (vgl. [125]). So ist zu beachten, dass in der akuten Phase einer Dermatoe, wenn Läsionen mit entzündlicher Exsudation vorliegen, die Auswahl der richtigen Grundlage einen höheren Stellenwert hat als die des Wirkstoffs. Während der Wirkstoff unter diesen Bedingungen entgegen dem Sekretionsdruck ohnehin kaum in die Haut eindringen kann, lässt sich z. B. durch die kühlende, entquellende und trocknende Wirkung von feuchten Umschlägen oder O/W-Lotionen eine Linderung erzielen. Erst danach rückt die Bedeutung der Wirkstoffe immer stärker in den Vordergrund. Im subakuten Stadium einer Dermatoe sind O/W- oder W/O-Emulsionen angebracht. Allgemein gilt, je akuter eine Dermatoe ist, um so weniger Fett sollte das verwendete Externum enthalten. Bei akuten entzündlichen, trockenen bis leicht nässenden Dermatosen (z. B. Sonnenbrand) sind Schüttelmixturen oder O/W-Cremes bzw. O/W-Lotionen indiziert, während im chronischen Stadium eher Pasten, Salben oder W/O-Emulsionen, bei trockenen, chronischen hyperkeratotischen Stadien auch Lipogele empfohlen werden. Neben den Wirkstoffeigenschaften sowie der Art und Lokalisation der Dermatoe ist schließlich auch der Hauttyp bei der Wahl der Grundlage zu beachten. Seborrhoiker mit fetter, glänzender Haut vertragen relativ schlecht fettreiche Grundlagen, da diese ihre Haut zusätzlich fetten und eine Okklusion bewirken. Besser toleriert werden in diesem Fall wasserreiche O/W-Emulsionen oder auch Schüttelmixturen. Seborrhoiker mit einer an Fettmangel leidenden trockenen und schuppigen Haut, die keine weitere Austrocknung durch Puder, puderhaltige- und wasserreiche Systeme vertragen, sollten eher mit W/O-Emulsionen und Salben behandelt werden. Zu beachten ist allerdings, dass Fettsalben nicht immer gut vertragen werden und häufig als unangenehm empfunden werden.

Der Wirkstoff kann je nach verwendetem Vehikel suspendiert oder gelöst vorliegen. Liegt er überwiegend suspendiert vor, bestimmen seine Löslichkeit und Teilchengröße sowie sein Diffusionskoeffizient in der Grundlage seine Freigabe. Die Lösungsgeschwindigkeit kann dabei zum limitierenden Faktor werden. Liegt der Wirkstoff vollständig gelöst im Vehikel vor, so steht er unmittelbar für die Freigabe zur Verfügung. Nachteilig ist allerdings, dass die thermodynamische Aktivität eines Wirkstoffs aus Lösungssystemen geringer ist als aus Suspensionssystemen. Im Verlauf der Freigabe kommt es zu Entleerungsvorgängen, die eine Reduktion der Wirkung zur Folge haben können [126].

In der Dermatologie und Kosmetik werden häufig Substanzen eingesetzt, die nach Möglichkeit auf der Haut oder im SC fixiert werden sollen. Hierzu gehören Hautantiseptika, Lichtschutzsubstanzen (UVA- und UVB-Absorber), Antioxidantien, Repellentien und Konservierungsmittel. Zubereitungen mit solchen Stoffen werden häufig großflächig aufgetragen, so dass selbst bei niedrigen Penetrationsraten eine erhebliche Belastung des Organismus auftreten kann. Dies trifft vor allem für Sonnenschutzmittel zu, die mehrmals am Tag nahezu über die gesamte Körperoberfläche verteilt angewendet werden und meist hochkonzentriert sind, um genügend hohe Lichtschutzfaktoren zu erreichen [127]. Es verwundert daher nicht, dass Lichtschutzsubstanzen als die häufigste Ursache für photoallergische Kontaktekzeme angesehen werden [128]. Über die systemischen Wirkungen dieser Substanzen ist bisher nur wenig bekannt.

Eine Reihe von Untersuchungen beschäftigt sich mit der Haftfähigkeit von Lichtschutzsubstanzen an humanem SC und deren Beeinflussung durch unterschiedliche Vehikel. In der Kosmetik ist der Begriff **Substantivität** gebräuchlich, um das Haften kosmetisch wirksamer Substanzen auf der Körperoberfläche zu charakterisieren [129]. Dieser Begriff ist inzwischen um die Aspekte Keratinabsorption und Wasserfestigkeit (Abwaschresistenz) erweitert worden [130]. Bei Lichtschutzmitteln steht die Abwaschfestigkeit neben einer Minimierung der Permeation im Vordergrund, um neben der Behinderung einer Resorption Verluste durch Schwitzen und Wasserkontakt zu vermeiden. Angestrebt wird der Aufbau einer lichtabsorbierenden Schicht im SC, u.U. durch Bindung an Keratin, die ein hohes Rückhaltevermögen der UV-Filter gewährleistet [131 – 133]. Da der isoelektrische Punkt von Keratin im schwach

sauren Bereich liegt, ist die Entwicklung von Lichtschutzmitteln mit kationischen Gruppen vorgeschlagen worden, die von negativ geladenen Proteinen im SC gebunden werden [134 – 136]. Bei Verankerung von Ammonium- oder Sulphoniumfunktionen an den UV-Absorber über eine Alkylkette konnte eine maximale Abwaschresistenz festgestellt werden, wenn eine C12-Kette als Spacer dient.

Sowohl wasserlösliche als auch öllösliche Lichtschutzsubstanzen zeigen in O/W-Emulsionen höhere Lichtschutzfaktoren als in W/O-Emulsionen [137, 138]. Dies wird auf eine verbesserte Penetration der UV-Absorber aufgrund einer stärkeren Hornschichtquellung bei höherem Wassergehalt zurückgeführt. Fluoreszenzmikroskopisch konnte bei Einsatz wässriger und wässrig-alkoholischer Lösungen von fluoreszierenden Lichtschutzsubstanzen eine homogene Fluoreszenz der Hornschicht beobachtet werden [139]. Weniger befriedigende Ergebnisse zeigten sich mit einer W/O-Creme und Vaseline. Befunde, die ein Eindringen der Lichtschutzsubstanzen nur bis zum Stratum granulosum zeigen, werden z.T. mit einer Bindung an epidermale Komponenten oberhalb der Körnerschicht erklärt. Sie könnten allerdings auch auf dem schnellen Abtransport in tiefere Hautschichten und der anschließenden Resorption beruhen. Anhand von p-Aminobenzoesäure-Zubereitungen in alkoholischen Vehikeln mit und ohne Kollagenzusatz konnte gezeigt werden, dass sich mit Proteinvehikeln die Substantivität erhöhen lässt [133]. Kollagen führt zu einer erhöhten Konzentration des UV-Absorbers im SC, was auf eine verzögerte Penetration durch Bindung der p-Aminobenzoesäure an das zugesetzte Protein zurückgeführt wird.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass eine optimale Lichtschutzsubstanz neben einer guten Hautverträglichkeit und Photostabilität eine möglichst geringe Hautpermeation aufweisen sollte, um eine Resorption weitgehend zu vermeiden. Gleichzeitig ist jedoch eine gewisse Anreicherung der Lichtschutzsubstanz im SC erwünscht, damit sich hier eine lichtabsorbierende, wasserresistente Schicht ausbildet. Diese beiden Kriterien können mit Substanzen erfüllt werden, die an Bestandteile des SC gebunden werden. Bei Wirkstoffen mit fehlender Substantivität sollten dagegen Vehikel eingesetzt werden, die aufgrund kleiner Haut/Vehikel-Verteilungskoeffizienten oder einer Fixierung im SC ein verbessertes Rückhaltevermögen auf der Haut oder besser noch im SC gewährleisten.

Die Wahl eines geeigneten Vehikels sollte idealerweise dazu beitragen, einen Wirkstoff in einem dem therapeutischen Ziel entsprechenden Konzentrations-Zeit-Profil an seinem Wirkort zur Verfügung zu stellen. Zu diesem Zweck steht eine Reihe bewährter klassischer ein- und mehrphasiger, flüssiger und halbfester Systeme, die nach ihrer physikalisch-chemischen Beschaffenheit klassifiziert werden, zur Verfügung (vgl. [141]). Im folgenden sollen einige aktuell diskutierte Vehikelsysteme hinsichtlich ihres kolloidchemischen Aufbaus und ihres Beitrags zu den mit der epikutanen Applikation verfolgten Zielstellungen betrachtet werden.

Mikroemulsionen. Die sogenannten Mikroemulsionen sind aus Wasser, Öl, einem hydrophilen Tensid und einem hydrophoben Kotensid bestehende Systeme, in denen die Grenzflächenspannung zwischen Öl und Wasser gegen Null tendiert. Der Begriff Mikroemulsion, der aufgrund der Vorstellung geprägt wurde, dass es sich hierbei um feinste Dispersionen von Öl in Wasser oder Wasser in Öl handelt, ist irreführend und steht mit den Eigenschaften dieser Systeme nicht im Einklang. Der geringe Durchmesser der dispergierten Tröpfchen, würde eine sehr große Oberfläche der inneren Phase und eine extrem hohe Grenzflächenenergie nach sich ziehen. Dementsprechend müsste für die Dispergierung eine hohe Energie aufgewendet werden und eine sofortige Destabilisierung eines solchen Emulsionssystems resultieren, die sich in einem Zusammenfließen der kleinen Tröpfchen äußern würde. Dies ist jedoch praktisch nicht der Fall. Der kolloidale Zustand von Mikroemulsionen entsteht vielmehr bei geeigneter Zusammenstellung der Komponenten spontan ohne Energieaufwand und ist thermodynamisch stabil. Durch Variation von Tensid und Kotensid kann in bestimmten Grenzen der Temperaturbereich, in dem die Mikroemulsion stabil ist, eingestellt werden. Oberhalb und unterhalb dieser Bildungstemperatur liegt das System als echte Emulsion (milchig trüb und salbenartig) vor, bildet sich jedoch im Bereich der Bildungstemperatur sofort von selbst zur Mikroemulsion zurück, die eine klare bis opaleszente, stark tyndallisierende, auffallend dünnflüssige, kolloidale Lösung darstellt.

Mikroemulsionen besitzen sowohl Eigenschaften von Emulsionen, z. B. lassen sich mit Laserstreulicht Teilchen mit einem Durchmesser von 10 bis 200 nm messen, als auch von Lösungen. So zeigen z. B. Wirkstoffe in Mikroemulsionen eine Sättigungslöslichkeit und keinen Verteilungskoeffizienten wie in Emulsionen und sind diese Systeme wie erwähnt

durch eine praktisch nicht messbare Grenzflächenspannung zwischen Öl- und Wasserkomponente sowie durch ihre thermodynamische Stabilität gekennzeichnet. Sie werden deshalb auch als "kritische Lösungen" beschrieben (vgl. [140]) und den einphasigen, flüssigen Systemen zugeordnet [141]. Das Öl ist dabei im Wasser gelöst und umgekehrt das Wasser im Öl. Im Nanosekundenbereich bilden sich Öltropfen und zerfallen wieder unter Bildung von wasserreichen Bereichen (s. Abb. 8). In einem größeren Zeitfenster kann das System dagegen besser als eine "kritische Lösung" beschrieben werden. Der hohe Wasser- und Ölanteil ($> 80\%$) verleiht den Mikroemulsionen ideale Eigenschaften als Universallösungsmittel für hydrophile und lipophile Substanzen. Bedingt durch die praktisch gegen Null tendierende Grenzflächenspannung penetriert eine Mikroemulsion relativ schnell in das SC und tritt in Wechselwirkungen mit den Barrierestrukturen, wobei sowohl Wirkungen auf die Lipiddomänen (Fluiditätsänderungen) als auch im Bereich der polaren Kopfgruppen (Hydratisierung) des SC resultieren können. Ein darin gelöster Wirkstoff wird mit der Mikroemulsion in die Haut gezogen und geht deshalb in kürzester Zeit praktisch vollständig in das SC über. Dies konnte mit Hilfe von radioaktiv markierten und fluoreszierenden Modellsubstanzen (vgl. [140]) nachgewiesen werden.

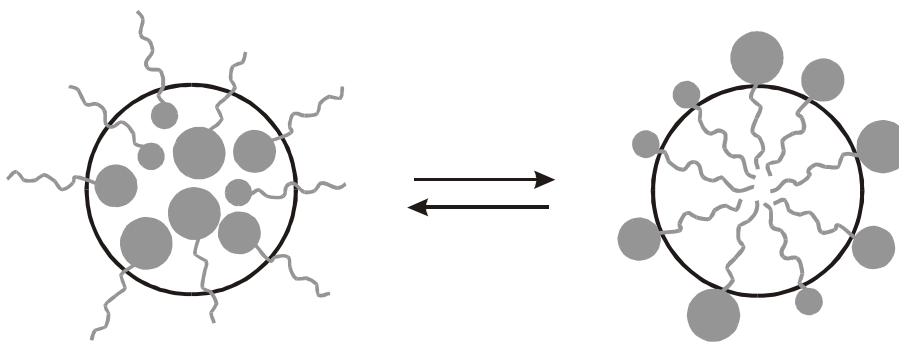


Abb. 8 Vereinfachte Darstellung des thermodynamischen Gleichgewichts zwischen öl- und wasserreichen Bereichen einer Mikroemulsion (nach [140])

Mit Mikroemulsionen ergeben sich Möglichkeiten einer **Steuerung des Wirkstofftransports** in der Haut [140]. Löst man einen lipophilen Wirkstoff in einer Mikroemulsionsgrundlage (definiert als Mikroemulsion ohne Wasser), so lässt sich eine Sättigungslöslichkeit feststellen. Gibt man nun schrittweise Wasser zu dem System, so bleibt zwar das kolloidale System

Mikroemulsion bis zu einem bestimmten Wasseranteil erhalten, es kommt aber zu einer Erhöhung der Hydrophilie des Systems und zu einer Abnahme der Sättigungskonzentration für die lipophile Substanz. Die resultierende Übersättigung führt zu einer erhöhten thermodynamischen Aktivität des Wirkstoffs und verstärkt sein Bestreben, das System zu verlassen. Dadurch nehmen die Geschwindigkeit der Penetration in tiefere Hautschichten und die Resorption erheblich zu. So zeigen Diclofenac-Mikroemulsionen mit zunehmender Übersättigung eine enorm steigende Hautpenetration und hinsichtlich der Permeationsgeschwindigkeit eine deutliche Überlegenheit gegenüber Voltaren® Emulgel [140]. Andererseits lässt sich auch gezielt die Resorption eines Wirkstoffs bei topischer Anwendung reduzieren. Hierzu verwendet man eine wasserreiche Mikroemulsion, in der der Wirkstoff in Konzentrationen eingesetzt wird, bei denen keine Übersättigung eintreten kann. Außerdem besteht die Möglichkeit, den Wassergehalt der Mikroemulsion so einzustellen, dass eine weitere Aufnahme von ungebundenem Wasser im SC zu einem Umkippen der Mikroemulsion in eine O/W-Makroemulsion führt. In diesem Fall wird der Wirkstoff, auch wenn vorher ein übersättigtes System vorgelegen hat, langsam aus den Öltröpfchen der O/W-Emulsion freigesetzt. Der Vorteil gegenüber Zubereitungen, die auf der Haut aufliegen und den Wirkstoff langsam an das SC abgeben, wie z. B. Cremes, besteht darin, dass nach Anwendung einer Mikroemulsion viel höhere Konzentrationen des Wirkstoffs im SC zur Verfügung stehen und hier länger fixiert werden können.

Ein bereits zugelassenes topisches Mikroemulsionspräparat ist **Contrafungin® Mikromuls** mit dem Wirkstoff Clotrimazol. Dieser liegt weit unter der Sättigungskonzentration vor. Der Wassergehalt ist so eingestellt, dass das System in der Haut durch weitere Wasseraufnahme in eine Makroemulsion umschlägt, aus der der Wirkstoff langsam freigesetzt wird. Diese Mikroemulsion bewirkt also eine schnelle Penetration in das SC, eine längere Fixierung des Arzneistoffs, verbunden mit einer Wirkungsverlängerung in der Haut und eine geringere systemische Belastung durch eine stark verlangsamte Resorption.

Ein topisches **Diclofanac-Mikroemulsionspräparat** befindet sich in der Zulassung. Mit diesem Präparat sollen eine verbesserte Wirkstoffpermeation durch die Haut und höhere Konzentrationen in subkutanen Bereichen erzielt werden. Dieses Ziel kann durch eine Minimierung der Wasserphase und eine hohe Wirkstoffkonzentration in der Mikroemulsion

erreicht werden. Nach dem Auftragen auf die Haut kommt es zur schnellen Penetration und durch weitere Wasseraufnahme im SC zu einer Übersättigung des Systems. Daraus resultiert eine hohe thermodynamische Aktivität des Wirkstoffs im SC, die zu einer erheblich schnelleren Permeation führt.

Ebenfalls eine Mikroemulsion ist das als kosmetisches Hautpflegeprodukt auf dem Markt befindliche **Capsoft®** mit 0,2 % Zinkpyrion als Wirkstoff. Durch die Mikroemulsion penetriert der Wirkstoff tiefer in das SC und kann so besser seine Wirkung entfalten. Klinische Studien belegen positive Effekte auf den Heilungsprozess der durch Psoriasis oder Neurodermitis geschädigten Haut.

Nanoemulsionen. Nanoemulsionen sind O/W-Emulsionen, bei denen die Tropfen der dispergierten flüssigen Lipidphase einen Durchmesser von 50 – 100 nm haben. Nicht eindeutig von diesen abzugrenzen sind die Submikron-Emulsionen, die üblicherweise eine Tropfengröße von 100 bis 500 nm aufweisen [142]. Häufig werden beide Begriffe synonym gebraucht. Solche Emulsionen werden seit längerer Zeit zur parenteralen Ernährung eingesetzt [143]. Weiterhin finden sie vermehrt als parenterale Arzneistoffträger Verwendung (vgl.[144]). Nanoemulsionen werden zwar noch nicht in dermatologischen Formulierungen genutzt, dürften jedoch für den Transport lipophiler Arzneistoffe besser geeignet sein als Liposomen. Im kosmetischen Bereich finden sie zunehmende Beachtung, da sie die Penetration von Wirkstoffen verbessern und positive Eigenwirkungen auf die Haut haben sollen, in dem sie durch Einschleusung geeigneter Lipide die Barrierefunktion des SC stärken und den transepidermalen Wasserverlust (TEWL) günstig beeinflussen [145]. Nanoemulsionen weisen allgemein einen Ölgehalt von 10 bis 20 % auf und sind mit 0,5 bis 2 % Phospholipiden (meist Soja-Lecithin) stabilisiert. Sie werden durch Hochdruckhomogenisation hergestellt. Die hierbei gebildeten Tröpfchen besitzen einen flüssigen lipophilen Kern, der nach außen zur Wasserphase durch eine monomolekulare Phospholipidschicht abgegrenzt wird (Abb. 9). Damit ist die Struktur solcher phospholipidstabilisierter Öltropfen mit der von Chylomikronen vergleichbar [146] und unterscheidet sich von Liposomen, bei denen eine bimolekulare Phospholipidmembran einen hydrophilen Innenraum abgrenzt (s. u).

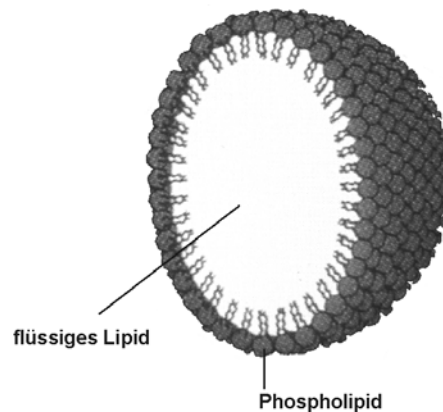


Abb. 9 Struktur eines durch Phospholipide stabilisierten Öltröpfchens einer Nanoemulsion nach [147]

Alternativ zu den phospholipidhaltigen Nanoemulsionen sind auch tensidfreie Submikron-O/W-Emulsionen beschrieben worden [148, 149].

Feste Lipidnanopartikel (SLN). Hierbei handelt es sich um Partikel der Größenordnung 50 – 100 nm mit einer Matrix aus festen, meist physiologischen Lipiden, die in wässriger Dispersion durch Tenside stabilisiert werden [150]. Daneben ist eine tensidfreie Stabilisierung der Dispersion mit viskositätserhöhenden Polymeren möglich. SLN werden u.a. als potenzielle Träger für hydrolyseempfindliche Wirkstoffe in wasserhaltigen Formulierungen in der Dermatologie und Kosmetik vorgeschlagen (vgl. [150]). Sie sollen aufgrund eines okklusiven Effektes zu einer Erhöhung der Hautfeuchtigkeit und Senkung des TEWL sowie zu einer gesteigerten Wirkstoffpenetration führen. Zur Charakterisierung des Verhaltens der SLN bei epikutaner Anwendung sind weitere Untersuchungen erforderlich.

Multiple Emulsionen. Multiple Emulsionen vom Typ W/O/W kommen bereits im kosmetischen Bereich zum Einsatz [151, 152]. Hierbei handelt es sich um komplexe Systeme, bei denen die Tropfen der dispergierten Phase ihrerseits zusätzlich kleinere Tröpfchen enthalten, deren Polarität derjenigen der äußeren, kontinuierlichen Phase ähnelt. Prinzipiell sind neben W/O/W auch O/W/O-Emulsionen möglich. Obwohl das Phänomen der multiplen Tropfenbildung bereits seit mehr als 100 Jahren bekannt ist, wurde erst 1965 als erste Verwendung einer multiplen Emulsion ein Verfahren entwickelt, das eine verbesserte Applikation von

Vaccinen ermöglichte, die bis dahin nur in Form von öligen bzw. Wasser-in-Öl-artigen Formulierungen injiziert werden konnten [153]. Dabei handelt es sich um ein Zweischrittverfahren, mit dem ein W/O/W-Emulsionssystem erhalten wurde, das nicht thrombotisch wirkte und eine erheblich verbesserte lokale Verträglichkeit zeigte. Bei diesem Verfahren wird in einem ersten Schritt eine W/O-Emulsion hergestellt, die in einem zweiten Emulgierschritt als Ölphase eingesetzt und in einer weiteren Wasserphase mit einem hydrophilen Emulgator reemulgiert wird. Die Zweischrittverfahren und verschiedene beschriebene Einschrittverfahren zur Herstellung multipler Emulsionen erwiesen sich allgemein als großtechnisch schwer umsetzbar und lieferten Produkte mit mangelhafter Stabilität (vgl.[152]). Diese Probleme wurden durch ein neuartiges Verfahren, als partielle **Phasen-Solubilisierungs-Inversionstechnologie (PPSIT)** bezeichnet, überwunden [154]. Dieses Verfahren beruht auf der Eigenschaft hydrophiler Emulgatoren (nichtionische, ethoxylierte Tenside), bei steigenden Temperaturen zunehmend lipophil zu reagieren (Verlust ihrer Hydrathüllen). Damit hergestellte O/W-Emulsionen zeigen daher beim Erwärmen eine Phasenumkehr unter Bildung von W/O-Emulsionen. Die hierfür erforderliche Temperatur wird als **Phaseninversionstemperatur (PIT)** bezeichnet. Bei der PPSIT werden eine elektrolythaltige Wasserphase und eine Lipidphase, bestehend aus einem polaren Öl, einem hydrophilen nichtionischen Emulgator und einem Stabilisator, getrennt über die PIT erwärmt. Beim Vereinigen beider Phasen bildet sich eine intermediäre W/O-Emulsion, aus der bei Temperaturabsenkung eine W/O/W-Emulsion entsteht, die schließlich durch Ausbildung eines Gelnetzwerks, das die einzelnen multiplen Tropfen umschließt, stabilisiert wird (vgl. [152]). Die partielle Phaseninversion zur W/O/W-Emulsion wird durch die Verwendung hydrophiler Emulgatoren in einer polaren Ölphase begünstigt, wenn diese mit Wasserphasen umgesetzt werden, die definierte Mengen eines Elektrolyten enthalten. Dabei kommt es zu einem partiellen Aussalzen des bei Raumtemperatur hydrophilen Emulgators, so dass dieser an allen Lipid-Wasser Grenzflächen stabilisierend wirken kann.

Die **Vorteile multipler Emulsionen** vom Typ W/O/W in kosmetischen Hautpflegepräparaten beruhen auf den folgenden Effekten. Unmittelbar nach dem Auftragen wird zunächst das Wasser der äußeren, kontinuierlichen Phase an die Haut abgegeben. Dies führt zu einer Kühlung und Feuchtigkeitsaufnahme. Gleichzeitig legt sich ein Schutzfilm aus den zurück-

bleibenden fusionierenden Öltropfen auf die Haut, der den TEWL reduziert und aus dem dann über einen längeren Zeitraum das Wasser der darin eingeschlossenen Wassertröpfchen an die Haut abgegeben wird. Das Ergebnis ist eine langfristig verbesserte Hautbefeuchtung und eine normalisierende Wirkung auch bei extrem trockener Haut.

Die PPSIT kommt bereits bei der Herstellung der ersten auf dem Markt befindlichen Gesichtspflegeprodukten auf der Basis von stabilen W/O/W-Emulsionen zum Einsatz (z.B. La Prairies Time Management Moisturizer, Nivea® Visage Optimale 3 bzw. Nivea® Visage Optimal Eye Care).

Denkbar ist weiterhin der Einsatz multipler Emulsionen als verzögerte Freigabesysteme für Wirkstoffe oder zum Schutz empfindlicher Inhaltsstoffe. Die PPSIT erlaubt z. B. die Einarbeitung von Arzneistoffen, die über einen längeren Zeitraum mit der Haut in Kontakt gebracht werden sollen, in die innerste disperse Phase, aus der eine langsame Freisetzung erfolgt.

Hydrolipid-Dispersionen. Hierbei handelt es sich um disperse Systeme mit einer hydrophilen kontinuierlichen Phase und einer lipophilen dispersen Phase. Im allgemeinen sind es emulsionsartige Systeme mit einem Gehalt an flüssiger Lipidphase zwischen 2 und 20 %. Abweichend von den klassischen Emulsionen erfolgt die aufgrund der Grenzflächenspannung zwischen Öl- und Wasserphase notwendige Stabilisierung bei Hydrolipid-Dispersionen nicht mit amphiphilen, tensidartigen Emulgatoren, sondern mit Hilfe von geeigneten Polymeremulgatoren. Besonders effektiv sind grenzflächenaktive Polymere wie Copolymere der Acrylsäure mit C₁₀₋₃₀-Alkylacrylaten, die zusätzlich quervernetzt sind (**Pemulen®**), oder **Methylhydroxypropylcellulose**. Diese bilden wie die klassischen Emulgatoren einen stabilen Grenzflächenfilm aus und verhindern so eine Koaleszenz der Lipidtropfen.

Ein bevorzugtes Einsatzgebiet der Hydrolipid-Dispersionen sind **Sonnenschutzmittel** (vgl. [155]). Sonnenschutzmittel auf der Basis von Hydrolipid-Dispersionen werden häufig als

emulgatorfrei ausgelobt. Dies ist physikalisch-chemisch nicht korrekt und widerspricht der IUPAC-Definition für Emulgatoren. Zutreffend ist allerdings, dass sie sich hinsichtlich ihres Irritationspotenzials deutlich von den mit klassischen Emulgatoren stabilisierten Emulsionen unterscheiden, da die Polymeremulgatoren nicht in das SC penetrieren. Sie gehen daher keine Wechselwirkungen mit den Bestandteilen der Hornschichtbarriere ein und können dementsprechend nicht zu Hautirritationen und „Mallorca-Akne“ führen. Hydrolipid-Dispersionen werden auch von Personen mit empfindlicher Haut gut vertragen. Da sie einen relativ geringen Lipidgehalt aufweisen, wird ihre Anwendung bevorzugt auf normaler oder fettfeuchter Haut empfohlen.

Pemulene[®] bestehen überwiegend aus dem hydrophilen Acrylsäureanteil und werden über die hydrophoben Alkylketten ihrer Alkylacrylat-Komponenten in der Phasengrenze der Lipidtropfen verankert. Es sind Makromoleküle mit einer relativen Molmasse von ca. $4 \cdot 10^9$. Das Polymer quillt nach Neutralisation mit einer geeigneten Base auf das 1000fache seines ursprünglichen Volumens. In wässrigem, salzarmem Milieu bilden Pemulene[®] dicke schützende Gelschichten um jeden Öltropfen. Bereits ein Anteil von 0,1 bis 0,3 % dieses Polymeremulgators ist ausreichend, um bei einem Lipidgehalt von 20 % lagerstabile Zubereitungen zu formulieren. Bei Kontakt mit dem elektrolythaltigen Milieu der Hautoberfläche wird die Dispersion destabilisiert, da die schützenden Gelschichten kollabieren. Infolge der Koaleszenz der Öltropfen scheidet sich daraufhin ein dünner Ölfilm auf der Hautoberfläche ab.

Im Unterschied dazu sind Hydrolipid-Dispersionen mit Methylhydroxypropylcellulose als Polymeremulgator wenig elektrolytempfindlich. In diesem Fall kommt es beim Auftragen auf die Haut infolge der mechanischen Einwirkung zu einem partiellen Brechen der Emulsion mit Abscheiden eines Ölfilms. Der Rest der Emulsion verbleibt teilweise als geschmeidiger Film mit in die Polymermatrix eingebetteten Öltropfen auf der Haut.

Liposomen. Liposomen sind Vesikel, die von einer bimolekularen Schicht amphiphiler Lipide (Lipiddoppelschicht, Membran) umhüllt sind. Die polaren Kopfgruppen der Lipide

sind jeweils zum wässrigen Innenraum bzw. zur kontinuierlichen wässrigen Außenphase ausgerichtet. Die lipophilen Molekülteile der beiden Lipidschichten sind einander zugewandt und bilden den hydrophoben Innenbereich der Membran (vgl. Abb. 10). Zur Herstellung **konventioneller Liposomen** werden hauptsächlich Phosphatidylcholine (PC; häufig in hydrierter Form) oder Phospholipid-Mischungen, die hauptsächlich PC enthalten (meist Soja-Lecithin) und geringere Anteile an Cholesterol und Glykolipiden verwendet. Strukturell ähnlich aufgebaute Vesikel, deren Membranen vorwiegend aus nichtionischen Tensiden oder Sphingolipiden bestehen, werden als Niosomen[®] bzw. Sphingosomen bezeichnet. Je nach Herstellungsverfahren und chemischer Zusammensetzung erhält man kleine unilamellare (SUV = small unilamellar vesicles), große unilamellare (LUV = large unilamellar vesicles), oligolamellare große (OLV = oligolamellar large vesicles) multivesikuläre (MVV = multivesicular vesicles) oder multilamellare große (MLV = multilamellar large vesicles) Liposomen (s. Abb. 10). SUV haben einen Durchmesser bis zu 50 nm und besitzen im Unterschied zu den größeren Liposomen eine erhebliche Membranspannung.

Bei den kleinstmöglichen SUV mit einem Durchmesser von 23 nm, die durch Ultraschall aus Eilecithin hergestellt werden [156], ist der Lipidanteil in der äußeren Monolayer fast doppelt so groß wie in der Innenschicht. Das Volumen der hydratisierten Doppelschicht ist etwa 4,5 mal so groß wie der wässrige Innenraum. Sie besitzen dementsprechend eine geringe Beladungskapazität und eine hohe Permeabilität ihrer Membran für hydrophile Wirkstoffe sowie einen metastabilen Membranzustand mit starker Neigung zur Fusion. LUV haben einen Durchmesser von > 50 nm und nahezu spannungsfreie Membranen. Durch geeignete Herstellungsverfahren kann eine ausreichende Größenhomogenität erreicht werden. Sie besitzen ein günstiges Verhältnis von wässrigem Innenvolumen zum Lipidvolumen und damit eine im Vergleich zur eingesetzten Lipidmenge hohe Beladungskapazität für hydrophile Wirkstoffe. Bei der Herstellung von LUV entstehen häufig OLV, die einige Lipidlamellen enthalten, durch die eine Verzögerung der Freisetzung von Wirkstoffen resultiert. Bei der Herstellung von MLV entstehen dagegen häufig Liposomen mit mehreren Vesikeln in einem größeren Vesikel (MVV). Der Durchmesser von MLV kann 100 nm bis zu einigen 1000 nm betragen. Sie besitzen eine größere Zahl konzentrischer Bilayer. Hydrophile Wirkstoffe werden aus MLV sehr langsam freigesetzt. Sie werden im Organismus nach parenteraler

Applikation bevorzugt von phagozytierenden Zellen, die vor allem in den RES-Organen auftreten, aufgenommen.

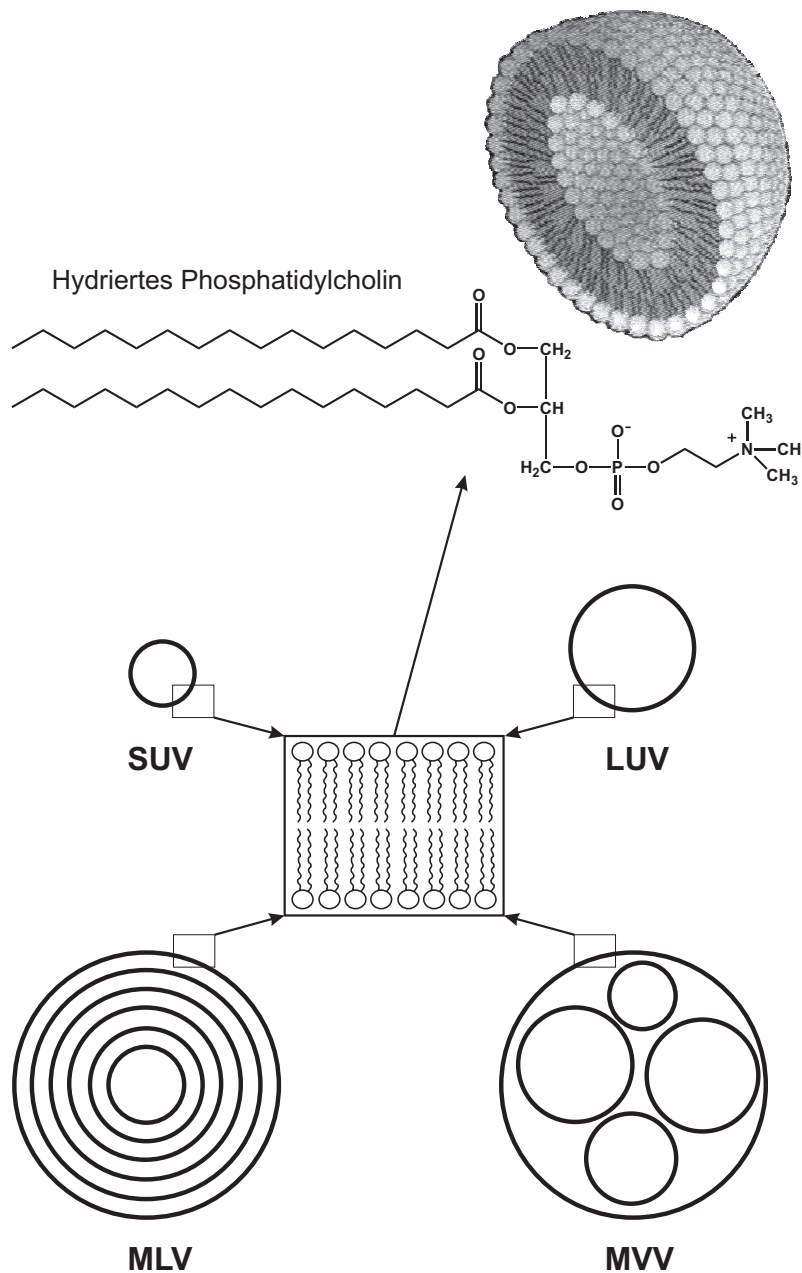


Abb. 10 Schematische Darstellung des Aufbaus von Liposomen (SUV = small unilamellar vesicles, LUV = large unilamellar vesicles, MLV = multilamellar vesicles, MVV = multivesicular vesicles) nach [147]

Die spontane Bildung von Vesikeln aus Phospholipiden und Wasser wurde bereits 1911 von Lehmann [157] beschrieben und durch mikroskopische Aufnahmen dokumentiert. Bangham

at. al. [158, 159] haben 1964 erstmalig mit der Elektronenmikroskopie die Struktur von multilamellaren Phospholipid-Vesikeln sichtbar gemacht und als erste deren Bedeutung als Modell für biologische Membranen erkannt. Mit den an diesem Modell gewonnenen Ergebnissen konnten wichtige Eigenschaften von Biomembranen aufgeklärt werden. Diese Erkenntnisse bildeten gleichzeitig eine der Grundlagen für die Entwicklung liposomaler Arzneimittel [160]. Die Bezeichnung Liposomen für diese Vesikel geht auf Weismann (1965) zurück. Obwohl seit längerer Zeit bekannt ist, dass die Wirkungen von konventionellen Liposomen in biologischen Systemen entscheidend durch PC als Hauptbestandteil der Membran bestimmt werden, findet in der kaum noch zu überblickenden Literatur zu diesem Gebiet der Begriff Liposomen auch für Vesikel anderer Amphiphiler Verwendung. Da diese häufig mit Phospholipiden lediglich die Fähigkeit zur Ausbildung vesikulärer Strukturen gemeinsam haben, ist die Forderung erhoben worden, nur Vesikel, die mit einer Doppelmembran aus PC umhüllt sind, als Liposomen zu bezeichnen [161].

Die **Entwicklung liposomaler Arzneimittel** wurde entscheidend von der Vision geprägt, dass sich damit eine Möglichkeit eröffnet, Arzneistoffe in zellähnliche Vesikel zu inkorporieren und nach parenteraler Applikation gezielt an den Wirkort zu bringen. Ein solches Drug Targeting sollte durch Modifizierung der Liposomenmembran und Funktionalisierung der Vesikeloberfläche erreichbar sein. Darüber hinaus wurde die Möglichkeit erkannt, Liposomen als Transportmittel für wasserunlösliche Wirkstoffe und als Freigabesystem mit Depoteffekt (Permeationsbarriere) für hydrophile Substanzen zu nutzen. So können lipophile Moleküle in die inneren Membranbereiche, hydrophile Moleküle im wässrigen Innenraum eingekapselt und amphiphile sowie geladene Moleküle an die Membranen adsorbiert werden. Durch die Wahl der Membranlipide, der Lamellenzahl und Vesikelgröße lassen sich die Beladungskapazität und Wirkstofffreisetzung variieren.

Vorteilhaft für die Entwicklung von PC-Liposomen im pharmazeutischen und kosmetischen Bereich waren neben ihren interessanten funktionellen Eigenschaften folgende Gesichtspunkte. PC ist das in biologischen Membranen am häufigsten vorkommende Lipid, das einzige Phospholipid, das industriell zu einem vertretbaren Preis gewonnen werden kann, und im Gegensatz zu mehreren hundert anderen amphiphilen Substanzen, die in Wasser ebenfalls Vesikel mit bimolekularen Membranen bilden, toxikologisch gut dokumentiert. PC aus

Sojabohnen wird seit den 50er Jahren als Wirkstoff in der Humanmedizin zum Schutz der Leber gegenüber toxischen Substanzen und zur Verminderung der Plaquebildung durch Veresterung von Cholesterol mit der Linolsäurekette eingesetzt (Essentiale[®], Lipostabil[®]). PC-reiche Fraktionen aus Hühnereiern werden ebenfalls seit dieser Zeit als Emulgatoren für Öle im Rahmen der parenteralen Fetterernährung eingesetzt (Intralipid[®], Lipofundin[®]). Seit den 70er Jahren wird PC zusammen mit Gallensäuren als Lösungsvermittler für Arzneistoffe in Parenteralia benutzt (z. B. Valium[®] MM). Für die topische Anwendung kommt seit den 60er Jahren eine Soja-PC-Fraktion als Penetrationshilfe für Heparin-Na und Aescin zum Einsatz (Essaven[®] Gel).

Die Entwicklung von Liposomenpräparaten wurde andererseits durch die Bereitstellung von gereinigtem PC vorangetrieben. Erst seit Beginn der 80er Jahre wird PC aus Sojabohnen und Hühnereiern in größeren Mengen auf dem Markt angeboten (Lipoid, Lucas Meyer, Nattermann), und heute im Maßstab von mehreren tausend Tonnen jährlich produziert, wobei Hauptabnehmer die Nahrungsmittelindustrie ist. Hydriertes PC ist seit Mitte der 80er Jahre verfügbar. Synthetisches PC und andere Phospholipide mit definierten Fettsäuren stehen im Kilogramm-Maßstab erst seit 1990 zur Verfügung und sind nach wie vor relativ teuer.

Pevaryl[®]-Lipogel^a mit dem Wirkstoff Econazol war das erste liposomale Arzneimittel, das 1988 nach nur vierjähriger Entwicklungszeit für die lokale Behandlung von Dermatomykosen zugelassen wurde. In den 90er Jahren folgten weitere liposomale Topika, wie die Heparin-Na-Präparate **Hepaplus[®]30 Emgel**, **Hepaplus[®]60 Emgel** (seit 1995 **Hepaplus[®]Liposom**) sowie **Heparin Pur-** und **Heparin Pur-forte-ratiopharm[®] Sprühgel^a**, und liposomale Parenteralia, wie **Am Bisome[®]** mit Amphotericin B zur Behandlung schwerer Systemmykosen, **Epaxal-Berna^a** mit inaktivierten Hepatitis A-Viren als erster liposomaler Impfstoff, **Dauno Xome[®]** und **Doxil[®]** mit den Anthracyclinen Daunorubicin bzw. Doxorubicin zur Behandlung des späten Stadiums des Karposi-Sarkoms bei AIDS-Patienten sowie **Alveofact[®]**, ein liposomales Surfactant-Präparat, das bei kritischer Sauerstoffversorgung beatmeter Frühgeborener in die Lunge instilliert wird.

^a Die gekennzeichneten Präparate sind inzwischen wieder vom Markt genommen worden

Andere in den 90er Jahren neu zugelassene PC-haltige Fertigarzneimittel, in denen PC nicht in Liposomen-Form vorliegt, sind **Abelect[®]**, das einen PC-Amphotericin B-Komplex enthält und eine mit Am Bisome[®] vergleichbare reduzierte Nephrotoxizität aufweist, sowie **Hametum[®] Creme**, die Hamamelis-Extrakt mit PC in einer O/W-Emulsion enthält und erfolgreich zur Behandlung der entzündeten Haut verwendet wird.

Daneben sind weitere liposomale Präparate in der Entwicklung und kommen in zahlreichen Kosmetika sowohl beladene als auch leere Liposomen zum Einsatz (s.u.).

Im folgenden soll auf einige Aspekte der topischen Anwendung von Liposomen näher eingegangen werden.

Obwohl die Wechselwirkungen zwischen Liposomen und der Haut in vielen Punkten noch unklar sind, kann davon ausgegangen werden, dass konventionelle PC-Liposomen als intakte hydrophile Vesikel nicht durch die Haut permeieren können. Dies wird durch die Ergebnisse mehrerer Untersuchungen belegt (z. B. [162 - 165]) und auf die Enge des polaren Transportweges zurückgeführt, für den ein virtueller Porendurchmesser von < 30 nm angenommen wird (vgl. [166]). Elektronenmikroskopische Untersuchungen nach topischer Applikation von Liposomen zeigten zwar Vesikel in tieferen Bereichen des SC [167], jedoch dürften diese das Ergebnis der Diffusion und Wechselwirkungen freier Lipidmoleküle und Membranfragmente mit SC-Lipiden sein [167-169]. Ähnliche Befunde wurden mit bestimmten Vesikeln nicht-ionischer Tenside erhalten [170].

Andererseits lassen sich mit der Anwendung liposomaler Wirkstoffpräparate auf der Haut indirekte **Penetrationenhancer-Effekte** und eine bessere Fixierung von Wirkstoffen im SC erzielen (**drug localizing effect**). Hierfür scheint allerdings nicht unbedingt die Liposomenform erforderlich zu sein, sondern allein die Anwesenheit von PC auszureichen. Für diese Effekte werden in der Literatur mehrere Erklärungen herangezogen (vgl. [166, 171]). Einerseits dürfte der **Mikrookklusionseffekt** der auf der Haut auftrocknenden Phospholipidlamellen die Penetration von hydrophilen und lipophilen Wirkstoffen in das SC fördern. Elektronenmikroskopisch konnte nach topischer Applikation von Liposomen zeitabhängig eine massive Fusion der Vesikel beobachtet werden [172, 173]. Die

Vesikelstruktur geht aufgrund des abnehmenden Wassergehalts offensichtlich bereits in den obersten Bereichen des SC verloren [162, 174]. Als Ergebnis des Auftrocknungsprozesses kommt es in diesen Bereichen und fortschreitend auf der Haut zu einer Reorganisation und Verschmelzung der Vesikel (Koaleszenz) unter Ausbildung multipler bimolekularer Lamellenstapel. Neben dem daraus resultierenden Mikrookklusionseffekt dürfte bei schwer löslichen Wirkstoffen, die im lipophilen Innenbereich der Liposomenmembran vorliegen, dabei die Ausbildung eines Wirkstoffdepots eine Rolle spielen, aus dem wegen der größeren Oberfläche eine effektivere Freisetzung in die Haut erfolgen kann. Darüber hinaus werden eine Erhöhung der Fluidität der Permeationsbarriere und/oder die Bildung von Defekten in oberen SC-Bereichen infolge der Diffusion von liposomalen Komponenten und deren **Wechselwirkungen mit SC-Lipiden** diskutiert [166]. Eine weitere Erklärung ist die erleichterte Penetration durch Bildung niedermolekularer Komplexe des Wirkstoffs mit liposomalen Lipiden [171].

Ausgangspunkt für die ersten Überlegungen, Krankheiten der Haut mit liposomalen Arzneimitteln zu behandeln, war der Befund, dass in Liposomen verkapselte Steroide über längere Zeit im SC fixiert werden [175]. Diese Überlegung führte zur Entwicklung von **Pevaryl®-Lipogel** (s.o.). Bei diesem Präparat ist das wasserunlösliche Econazol stabil in die lipophile Phase der PC-Doppelmembran inkorporiert [176]. Im Vergleich zu einer entsprechenden Creme ergibt sich eine doppelt so hohe Eindringtiefe in die Haut und eine überlegene Wirksamkeit [177].

Als wesentlicher Effekt der in zahlreichen Kosmetika eingesetzten Leerliposomen wird die verbesserte Hydratation der Haut angesehen [178]. Gestützt wird die Annahme einer günstigen Beeinflussung der Barrierestrukturen der Haut durch PC-Liposomen u.a. durch den Befund, dass sich die lichtinduzierte Erythem-Schwelle nach Vorbehandlung mit Liposomen verdoppelt [179]. Dieser Befund unterstreicht außerdem auch die positiven Ergebnisse, die mit Hametum® Creme bei der Behandlung der entzündeten Haut erzielt werden [180]. Diese enthält Hamamelis-Extrakt und PC in einer O/W-Emulsion (s.o.).

Die mit liposomalen Zubereitungen offensichtlich realisierbare Fixierung von Wirkstoffen in den obersten Hautschichten ist auch für **Sonnenschutzpräparate** mit einer minimierten

systemischen Belastung durch die Lichtschutzsubstanzen und einer verbesserten Wasserfestigkeit von Interesse (s.o.; vgl. [181, 182]).

Auch im Bereich der Kosmetik wird in den letzten Jahren zunehmend diskutiert, ob die positiven Wirkungen zwingend an die vesikulären Strukturen gebunden sind oder ob die Anwesenheit der entsprechenden Lipide (Phospho-, Sphingolipide) in der Formulierung zum gleichen Ergebnis führt [147]. Für den Einsatz in der Kosmetik ist die allgemein als sehr gut eingestufte Hautverträglichkeit der Phospholipide sowie die in Bezug auf ihre Verwendung in Lebensmitteln und Kosmetika festgestellte toxikologische Unbedenklichkeit gem. Richtlinien der EG und FDA (GRAS-Status) besonders wichtig. Allerdings ist bekannt, dass sehr hohe Dosen an Phospholipiden, die über längere Zeit topisch angewandt werden, bei trockener und normaler Haut zu Irritationen und Veränderungen des dermalen Lipidstoffwechsels führen können (Feedback-Mechanismus) [183].

Gele mit **Heparin-Na** und PC als Hilfsstoff sind seit mehr als drei Jahrzehnten im Einsatz (Essaven[®] Gel, s.o.). Bei den in den 90er Jahren zugelassenen Präparaten Hepaplus[®]30 Emgel, Hepaplus[®]60 Emgel (seit 1995 aus Marketinggründen Hepaplus[®]Liposom) und Heparin PUR ratiopharm[®] Sprühgel handelt es sich um liposomale Formulierungen zur Behandlung von Blutergüssen und Stauungen. Diese sollen gegenüber PC-freien Präparaten eine deutliche Verbesserung der Mikrozirkulation in der Dermis bewirken. Voraussetzung dafür ist ein Eindringen von Heparin in tiefere Hautschichten. In diesem Zusammenhang wird eine Diffusion kleinerer Heparin-PC-Aggregate durch das SC diskutiert, die durch die Alkoholkomponenten und den Mikrookklusionseffekt der Formulierungen unterstützt werden dürfte (vgl. [170]). Bei Anwendung des Sprühgels von ratiopharm verdampfen nach dem Aufsprühen der flüssigen Liposomendispersion auf die Haut das darin enthaltene Ethanol und Wasser teilweise. Dabei ändert sich der Dispersitätsgrad der Liposomen von kleinen uni- bzw. oligolamellaren Vesikeln über große multilamellare Vesikel bis hin zu einer lamellaren Mesophase mit gelartiger Konsistenz [184]. Nach den vorliegenden Ergebnissen scheint sich der kolloidale Zustand der Phospholipide beim Auftrocknungsprozess nicht zu ändern, sondern lediglich das Ausmaß der Verteilung der flüssig-kristallinen Phase. Auch in diesem Fall dürfte demnach nicht der Dispersitätsgrad der Liposomen für den Wirkstofftransport durch das SC maßgeblich zu sein, sondern allein die Anwesenheit von PC.

Inzwischen liegen zahlreiche experimentelle und z. T. auch klinische Studien zum Einsatz topischer Wirkstoffzubereitungen mit Liposomen oder PC vor (vgl. [165]). Diese betreffen neben den bereits erwähnten zugelassenen liposomalen Arzneimitteln weitere Antimykotika-Präparate, Antibiotika, Virustatika, Antineoplastika, Cyclosporin, Lokalanästhetika, nicht-steroidale Antiphlogistika, Steroide, photoaktive Substanzen (Psoralene, Porphyrine) sowie einige biologische Makromoleküle und sollen im folgenden beschränkt auf eine Auswahl wichtiger Ergebnisse zusammengefasst werden.

Antimykotika. Econazol und Econazol-Nitrat in liposomalen Formulierungen zeigen eine deutliche Überlegenheit gegenüber konventionellen Creme- und Gel-Zubereitungen oder Lotionen des Wirkstoffs [185 - 187]. Neben Pevaryl®Lipogel (Cilag) sind inzwischen ein weiteres Econazol-Präparat, Ifenec®Lipogel (Italfarmaco), und die Miconazol-Präparate Micotef®Lipogel (LPB) sowie Daktarin® in Liposomenform auf dem Markt.

Antibiotika. Zur Behandlung von Akne und Infektionen im Bereich der Haut und angrenzenden Gewebe eingesetzte Antibiotika wie Clindamycin [188] und Tobramycin [189] erweisen sich in liposomaler Form als deutlich besser wirksam als Zubereitungen mit den freien Wirkstoffen.

Virustatika. An Meerschweinchen konnte bei topischer Anwendung von liposomalem Aciclovir und Interferon im Vergleich mit Zubereitungen der freien Substanzen eine verbesserte Wirksamkeit gegen Herpes genitalis festgestellt werden [190, 191].

Antineoplastika. Versuche an Nacktmäusen zeigen nach epikutaner Applikation von liposomalem Methotrexat eine 3- bis 4fach längere Retention in der Haut als nach Anwendung einer Lösung [192].

Cyclosporin. Untersuchungen mit verschiedenen Cyclosporin-Formulierungen zeigen nach epikutaner Applikation eine Wirkstoffakkumulation im SC in der Reihenfolge: Hautlipid –

Liposomen > PC-Liposomen > O/W-Emulsion > wässrig-ethanolische Lösung. Die Permeation durch die Haut wird dagegen am besten durch eine wässrig-ethanolische Lösung gefördert, wobei die in tieferen Hautschichten auftretenden Wirkstoffmengen in der Reihenfolge wässrig-ethanolische Lösung >> PC-Liposomen > Hautlipid-Liposomen > O/W-Emulsion abnehmen.

Berücksichtigt man verschiedene Liposomen-Typen, so ist das Rückhaltevermögen von Cyclosporin im SC in folgender Reihenfolge ausgeprägt: Hautlipid-MLV > PC-MLV ~ Haut-Lipid-LUV > PC-LUV >> O/W-Emulsion [193 - 195].

Lokalanästhetika. Die epikutane Applikation von Lidocain [196-198] oder Tetracain [196, 199, 200] in Liposomenform führt zu einer verlängerten Wirkung in der Haut. Autoradiografische Untersuchungen mit ^{14}C -Lidocain an Meerschweinchen dokumentieren im Vergleich zu einer Creme höhere Aktivitäten in der Epidermis und Dermis bei Anwendung von Liposomen [197].

Nichtsteroidale Antiphlogistika. Untersuchungen an der Ratte mit einer PC-haltigen **Indomethacin**-Formulierung demonstrieren eine 4fache Steigerung der Penetration [201]. Mit der Stripping-Technik konnte nach epikutaner Anwendung kleiner unilamellarer oder großer multilamellarer Soja-PC-Liposomen mit 10 – 20 % des antiphlogistischen Wirkstoffs **2-(t-Butyl)-4-cyclohexylphenylnicotinat-N-oxid** eine Eindringtiefe der Substanz in das humane SC von 10 μm festgestellt werden. Mit einer O/W-Emulsion betrug diese nur 3 μm . Am Mäuseohr-Ödem-Modell waren jedoch beide Formulierungen gleich wirksam [202].

Nach epikutaner Applikation von **Diclofenac-Liposomen** konnte im Vergleich zu einer Arzneistofflösung *in vivo* eine 5fach höhere Bioverfügbarkeit im Serum (25 vs. 5 %) festgestellt werden. Auch in diesem Fall zeigten sich *in vitro* keine Wirksamkeitsunterschiede [203, 204].

Steroide. Liposomales **Hydrocortison** ist in Bezug auf die räumliche Verteilung in der Haut und das zeitliche Penetrationsprofil konventionellen Salben deutlich überlegen. Mit liposomalen Formulierungen können über längere Zeit hohe Konzentrationen des Wirkstoffs im SC ohne eine systemische Belastung des Organismus erzielt werden [205 - 207]. Bei Anwendung von Corticosteroiden in Liposomen wurde eine verlängerte Wirkung beobachtet [208].

Die perkutane Resorption von **Estradiol** kann in ähnlicher Weise durch Inkorporation in Liposomen verändert werden [209]. Dagegen ist **5 α -Dihydrotestosteron** nach epikutaner Applikation nur bei Anwendung einer Lösung in Aceton, jedoch nicht in liposomaler Form wirksam [210].

Liposomales **Progesteron** und eine Dispersion des Wirkstoffs in einer Agarose-Matrix unterscheiden sich in ihrer Freigabe. Während aus der Dispersion mit schnell abnehmender Geschwindigkeit 90 % des Wirkstoffs in 24 h freigesetzt werden, erfolgt die Freigabe aus der liposomalen Form mit einer Kinetik nullter Ordnung [211]. Liposomen, die aus Phospholipiden mit gesättigten Ketten (Dimyristoyl- oder Dipalmitoylphosphatidylcholin) hergestellt werden, zeigen eine 10fach langsamere Progesteron-Freigabe als Liposomen aus Lipiden des gleichen Typs mit ungesättigten Ketten [212]. In einem Bericht über die epikutane Behandlung von **Hirsutismus** mit einer liposomalen Progesteron-Zubereitung wird auf eine 2/3-Erfolgsquote hingewiesen [213].

Photoaktive Substanzen. In Studien zur photodynamischen Therapie wird auch über den Einsatz liposomaler Formulierungen mit **Psoralenen** und **Porphyrinen** berichtet [214, 215].

Biologische Makromoleküle. Die subkutane Injektion von liposomal verkapselter **Superoxiddismutase** (SOD) hemmt die Entstehung einer durch γ -Strahlen induzierten Fibrose [216]. Es wäre interessant, zu prüfen, ob vergleichbare Effekte auch mit epikutan applizierten Liposomenpräparaten der Cu-/Zn-SOD erzielt werden können.

UV-Bestrahlung führt in der Haut zu einer Abnahme der SOD-Aktivität. Eine epikutane Vorbehandlung von Mäusen mit liposomal verkapselter SOD bewirkte eine Hemmung des UV-induzierten Aktivitätsverlustes der SOD in der Haut [217].

Nach epikutaner Applikation von **Insulin** in ultraflexiblen Lipidvesikeln (Transfersulin®), die allgemein als Transfersomen bezeichnet werden [165, 218], konnten in Tierversuchen und beim Menschen überzeugende Senkungen der Glucose-Blutspiegel nachgewiesen werden, während Insulin-Zubereitungen mit konventionellen PC-Liposomen oder Mischmizellen keine systemischen Effekte zeigten [165, 219, 220].

Mit Hilfe des kutanen Meerschweinchen-Herpes-simplex-Modells konnte eine verbesserte Penetration von **Interferon** nach Anwendung liposomaler Formulierungen festgestellt werden [190, 191, 221]. Bei Untersuchungen an Menschen, Nacktmäusen und Hamstern ließen sich 24 h nach epikutaner Applikation von liposomalem γ -Interferon noch 70 bis 80 % des Interferons auf und in der Haut nachweisen, davon 25 bis 30 % im SC und nur 0,9, 0,3 bzw. 6,1 % in tieferen Hautschichten [222]. Eine erhebliche Steigerung der Hautpermeation von ^{125}I - γ -Interferon konnte an Mäusen mit Transfersomen erzielt werden [165].

Die Assoziation **monoklonaler Antikörper** mit PC-Liposomen bewirkte unter Okklusion eine schnelle Penetration der Schweinehaut [223]. In einer weiteren Studie an Ratten konnte durch eine epikutane Applikation von liposomalen **Anti-Doxorubicin-Antikörpern** die durch das Zytostatikum induzierte Alopezie gehemmt werden [224]. Damit wird belegt, dass bei epikutaner Applikation entsprechender liposomaler Zubereitungen die Penetration von Antikörpern ermöglicht wird (Follikel-Weg?), ohne dass deren biologische Aktivität verlorengeht.

Weiterhin wird über die Hautpenetration des DNA-Reparaturenzyms **T4-Endonuclease V** nach Anwendung einer liposomalen Zubereitung und die dadurch bedingte Stimulation der Elimination von Cyclobutan-Pyrimidin-Dimeren, deren Bildung in der Haut durch UV-Strahlen induziert wird, berichtet [225].

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass durch die heute vorliegenden Ergebnisse die Möglichkeiten und Grenzen des Einsatzes von Liposomen oder PC in topischen Zubereitungen erkennbar werden. **Konventionelle PC-Liposomen** bzw. PC als Hilfsstoff dürften danach vor allem für die Fixierung von Wirkstoffen in den oberen Bereichen der Epidermis und aufgrund gewisser penetrationsfördernder Eigenschaften eine aussichtsreiche Perspektive haben.

Als potenzielle Wirkstoffträger für einen transdermalen Transport sind dagegen in den letzten Jahren ultraflexible Lipidvesikel, **Transfersomen**, entwickelt worden. Diese sollen sich aufgrund ihrer ausgeprägten Deformierbarkeit besser an die engen interzellulären Transportwege des SC anpassen können und dürften wegen ihres hohen Gehalts an oberflächenaktiven Komponenten während ihres Durchtritts durch die Haut auch die SC-Lipide fluidisieren. Wie bereits gezeigt wurde, ermöglichen Transfersomen die Permeation größerer Mengen kleiner (Diclofenac, Tamoxifen, Hormone) sowie selbst großer und hydrophiler Moleküle (Antikörper, Calcitonin, Insulin) durch die Haut mit einer Effizienz von > 50 bis 100 % (vgl. [165, 218 - 220]). Obwohl bereits erste ermutigende Ergebnisse von Humanuntersuchungen mit diesem Vesikel-Typ vorliegen, ist eine seriöse Bewertung gegenwärtig noch nicht möglich. Insbesondere sind weitere Studien zur Hautverträglichkeit von Transfersomen erforderlich.

3 Untersuchungen, Ergebnisse und Diskussion

3.1 Herstellung von Liposomen zum Einsatz in ESR-Untersuchungen

3.1.1 Lipidgrundlagen für die Liposomenherstellung

Die am häufigsten zur Liposomenherstellung eingesetzten Grundlagen sind Sojabohnen-Lecithinfraktionen unterschiedlicher Reinheit [226]. Daneben werden auch Ei-Lecithine verwendet, die wegen ihrer geringeren Allergenität von der FDA generell für die Herstellung von Parenteralia empfohlen werden [227]. Der Begriff „Lecithin“ wird heute in der Regel für die Bezeichnung des komplexen Gemisches in Aceton unlöslicher „polarer“ Lipide verwendet, das hauptsächlich aus Phosphatidylcholin-Derivaten (PC) und anderen Phospholipiden, z.B. Phosphatidylethanolamin und Phosphatidylinositol, besteht. Bei den in den natürlichen Diacylglycerinphosphatiden enthaltenen Fettsäuren handelt es sich um die gleichen Säuren, die auch in Neutralfetten vorkommen. Meist liegt in sn-1-Position eine gesättigte Fettsäure (vorwiegend Palmitinsäure), in sn-2-Position eine ungesättigte Säure (Ölsäure, Linolsäure oder höhere Homologe) vor. Bei der Extraktion aus biologischem Material erhält man immer Gemische. Daneben stehen auch Diacylglycerinphosphatide mit hydrierten Fettsäuren und partialsynthetische Phospholipide mit definierten Fettsäuren zur Verfügung.

Für die Untersuchungen dieser Arbeit wurden die Sojabohnenlecithine Phospholipon 80 (P80) und Phospholipon 80H (P80H) sowie die partialsynthetischen Grundlagen Dioleoyl- und Dipalmitoylphosphatidylcholin bzw. Dipalmitoylphosphatidylglycerol ausgewählt (DOPC, DPPC bzw. PG, vgl. 5.1.1). Der Vergleich von Zubereitungen aus diesen Grundlagen sollte Aussagen zur Bedeutung der natürlichen Begleitsubstanzen wie z.B. Lysophosphatidylcholin auf die untersuchten Eigenschaften von Liposomen erlauben.

Darüber hinaus fanden die kommerziellen Liposomensysteme Presomen[®] C1 und Presomen[®] PPG-I Verwendung, bei denen es sich um pulverförmige Lipidgrundlagen handelt, die direkt in Lösungen der zu verkapselnden Substanzen dispergiert werden können.

3.1.2 Herstellung von Liposomen durch Membranextrusion

Die Liposomenherstellung wird dadurch möglich, dass sich Vesikel mit bimolekularen Membranen spontan als Ergebnis von Wechselwirkungen zwischen den eingesetzten Phospholipiden und Wasser formieren. Das Hauptaugenmerk bei der Herstellung von Liposomen liegt auf der Erzielung der gewünschten Größe und Struktur sowie auf dem effizienten Einschluss des zu verkapselnden Wirkstoffs und der ausreichenden Stabilität in der Zubereitung.

Die Verringerung der Größe und Lamellarität primär gebildeter multilamellarer Liposomen kann über verschiedene Verfahren erfolgen, wie z.B. die Membranextrusion, Hochdruckhomogenisation, Ultraschallbehandlung und Homogenisation mit dem Ultra-Turrax. Dabei sollen möglichst Liposomen mit definierter Größe und geringer Größenverteilungsbreite entstehen, welche die gewünschten biopharmazeutischen Eigenschaften besitzen (vgl. 2.2.3.).

Anhand von Vorversuchen wurde das Verfahren der Membranextrusion mit dem LiposoFast®-Membranextruder (AVESTIN®, Canada) als Herstellungsmethode ausgewählt. Auswahlkriterien waren dabei die Möglichkeit einer Variation der Liposomengröße durch Veränderung der Herstellungsbedingungen und das geringe Mindestvolumen der zu homogenisierenden Probe, da die eingesetzten Spinsonden und z.T. auch die Phospholipide relativ teuer sind. Mit dem verwendeten LiposoFast-Membranextruder können unilamellare Liposomen erhalten werden, indem man eine multilamellare Liposomendispersion mit einer gasdichten Spritze durch eine Polycarbonatmembran mit definierten Porenweiten in eine andere gasdichte Spritze des Gerätes extrudiert. Der Vorgang kann aufgrund der selbstreinigenden Wirkung der Vor- und Zurückextrusion durch den gleichen Filter mehrfach wiederholt werden, ohne dass dieser verstopft.

Die LiposoFast®-Stabilizer-Vorrichtung ermöglicht den wiederholten Gebrauch des Membranextruders und das Extrudieren hochkonzentrierten Probenmaterials. Auf diese stabilisierende Vorrichtung passen 0,5 ml- und 1,0 ml-Spritzen. Sie ermöglichen die Extrusion von Formulierungen mit Volumina zwischen 0,1 und 1,0 ml. Je nach Formulierung sind 11 bis 21 Zyklen ausreichend, um Liposomen uniformer Größe und Verteilung herzustellen. Die Liposo-

mengröße lässt sich durch die Auswahl geeigneter Membranfilter und Rezepturen variieren. Eine Temperierung kann durch Eintauchen des gesamten Extruders in ein Wasserbad erfolgen [228].

3.1.2.1 Herstellung von Liposomen mit variierendem Dipalmitoylphosphatidylglycerol-Gehalt in der Lipiddoppelmembran

In Liposomenzubereitungen können während der Lagerung Aggregationen bzw. Fusionen der Vesikel in erheblichem Ausmaß auftreten und Veränderungen der ursprünglichen Liposomengröße und -lamellarität nach sich ziehen. Aggregation und Sedimentation von neutralen Liposomen kann durch Van der Waals-Wechselwirkungen verursacht werden. Sie sind in großen Vesikeln stärker ausgeprägt, in denen die verringerte Krümmung der Membranen größeren Bereichen gestattet, in Kontakt miteinander zu treten. Die sich daraus ergebende Instabilität der Vesikel kann am leichtesten durch die Einführung einer kleinen Menge negativ geladener Bestandteile (z.B. 10 % Phosphatidsäure oder Phosphatidylglycerol) in die Lipidmischung behoben werden [226].

Im folgenden Versuch sollte der Einfluss steigender Anteile von Phosphatidylglycerol (PG) in der Liposomenmembran auf die Größe, den Polydispersitätsindex und das Zetapotenzial (vgl. 5.2.3) und damit auf die zu erwartende Stabilität von extrudierten Liposomen untersucht werden.

Hergestellt wurden Liposomen aus den Lipidgrundlagen DOPC, DPPC, P80 und P80H mit einem molaren Anteil von 0; 2,5; 5,0; 10,0 und 20,0 % PG in den Membranen nach der unter 6.3.1. beschriebenen Methode. Der Lipidgehalt der Formulierungen betrug 5 %. Die Extrusion der Vesikel erfolgte durch zwei Membranfilter mit der Porengröße 200 nm. Die Vermessung der Teilchen erfolgte mit der Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS) und Laserdoppleranemometrie (vgl. 5.2.2. und 5.2.3.).

Der Einbau von steigenden Anteilen an Phosphatidylglycerol in die Membranen führt zu einer Abnahme des Durchmessers von Liposomen aus den Lipidgrundlagen DOPC, DPPC und

P80H (Abb. 11). Der Durchmesser von DPPC- und P80H-Liposomen wird durch den Zusatz von 20 % PG um mehr als 40 nm reduziert, während der Zusatz der gleichen Menge an PG zu DOPC-Liposomen nur eine geringe Abnahme des Durchmessers (ca. 20 nm) zur Folge hat. Die Größe von Liposomen aus der Grundlage P80 wird durch den Zusatz von PG nur geringfügig verändert.

Bei der Vermessung von Teilchengrößen durch die Photonenkorrelationsspektroskopie erfolgt neben der Berechnung eines mittleren Teilchendurchmessers die Bestimmung des Polydispersitätsindex, der ein Maß für die Größenverteilungsbreite der Teilchen ist (vgl. 5.2.2.). Liposomen aus DOPC bzw. P80 weisen unabhängig von der Konzentration an PG in ihren Membranen einen niedrigen Polydispersitätsindex und damit eine enge Vesikelgrößenverteilungsbreite auf.

Der Zusatz von PG zu DPPC hat dagegen einen deutlichen Einfluss auf den Polydispersitätsindex. DPPC-Liposomen ohne Zusatz von PG bilden nach der Extrusion ein Gel aus, das nicht resuspendiert werden kann. Ein PG-Zusatz von 2,5 % führt zu einer breiten Verteilung der Vesikelgrößen, die ab einer Konzentration von mehr als 5 % in eine enge Verteilung übergeht. P80H-Liposomen weisen keine deutliche Abhängigkeit von der Konzentration an PG in ihren Membranen auf.

Inwieweit die Veränderungen des Liposomendurchmessers und des Polydispersitätsindex von der Viskosität der Membranen abhängig sind, sollte nachfolgend untersucht werden.

Zur Charakterisierung der Fluidität der Membranen von Liposomen können die Polarisationsindizes der Fluoreszenzmarker DPH und DPH-TMA verwendet werden. Aufgrund ihrer verschiedenen Struktur und Ladung (vgl. 5.2.4) werden sie in unterschiedlichen Positionen der Lipiddoppelmembranen eingelagert. Während für das ungeladene DPH-Molekül ein Aufenthaltsort im Bereich der Alkylketten der Phospholipide angenommen wird, befindet sich das positiv geladene DPH-TMA aufgrund seiner Ladung nahe der Kopfgruppen der Phospholipide an der Membranoberfläche [229]. Die Bestimmung der Polarisationsindizes erfolgte nach der unter 7.5.4 beschriebenen Methode.

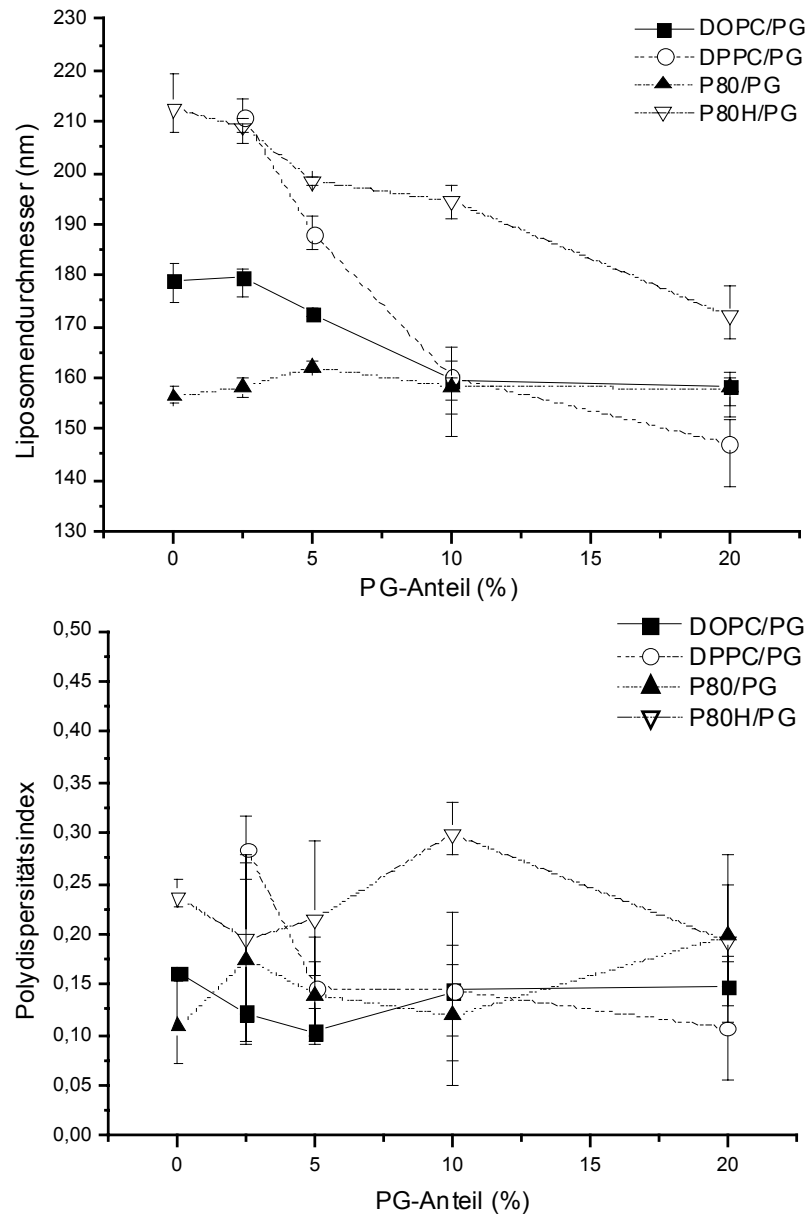


Abb. 11 Liposomendurchmesser und Polydispersitätsindex in Abhängigkeit von der Konzentration an PG in den Membranen von Liposomen aus den Grundlagen DOPC, DPPC, P80, P80H ($\bar{x} \pm R$, $n = 3$)

Die Polarisationsindizes der Fluoreszenzmarker in den untersuchten Liposomen weisen erwartungsgemäß deutliche Unterschiede auf (Abb. 12). In Liposomen mit den Grundlagen DOPC bzw. P80, deren Membranen sich im Zustand der Flüssig-Phase befinden, haben die Fluoreszenzmarker niedrige Polarisationsindizes ($<0,25$). Dagegen weisen die Marker in Liposomen aus DPPC bzw. P80H, deren Phasenübergangstemperaturen oberhalb der Messtemperatur liegen, hohe Polarisationswerte auf ($>0,35$), da sich die Membranen im

Zustand der Gel-Phase befinden. Deutliche Unterschiede zwischen den Polarisationsindizes ergeben sich ebenfalls durch den Einsatz der verschiedenen Fluoreszenzmarker. Während die Werte der Polarisationsindizes von DPH in Liposomen aus DOPC bzw. P80 unter denen von DPH-TMA liegen, treten diese Unterschiede in Liposomen aus DPPC bzw. P80H nicht auf. Diese Unterschiede sind auf die Struktur der verwendeten Phospholipide zurückzuführen. Durch Cis-Doppelbindungen im Fettsäureanteil der Phospholipide von DOPC bzw. P80 entstehen Störungen in der Packung der Moleküle, sogenannte Kinken, die einen erhöhten Platzbedarf der Einzelmoleküle nach sich ziehen [226]. Da die Doppelbindungen meist ab Position 9 der Fettsäureketten auftreten, ist die Beweglichkeit von DPH ab dieser Position besonders erhöht, während die Packungsdichte der Phospholipide und damit die Beweglichkeit von DPH-TMA im Bereich der Kopfgruppen weniger stark beeinflusst wird.

Da Doppelbindungen durch Hydrierung der Lipide in Liposomen aus DPPC bzw. P80H vollständig fehlen und keine Kinkenbildung auftritt, sind nur geringe Unterschiede in den Polarisationsindizes der Fluoreszenzmarker DPH bzw. DPH-TMA messbar und die Werte sind gegenüber denen der Marker in Liposomen aus DOPC bzw. P80 generell erhöht.

Der Zusatz von PG zu den Lipidmembranen zieht nur geringe Änderungen der Polarisationsindizes und damit der Membranfluiditäten der Liposomen nach sich. Die größte Änderung des Polarisationsindex tritt nach dem Zusatz von 20 % PG zu P80H-Liposomen auf, wodurch der mit DPH bestimmte Polarisationsindex ansteigt. Dieser Anstieg belegt eine Erhöhung der MembranstEIFigkeit im Bereich der Fettsäureketten der Phospholipiddoppelmembranen von P80H-Liposomen.

Eine Abhängigkeit zwischen den mit steigenden Anteilen von PG einhergehenden Veränderungen der Liposomendurchmessern bzw. Polydispersitätsindizes und dem Polarisationsindex konnte über eine Regressionsanalyse mit P als Einflussgröße und dem Liposomendurchmesser bzw. PI als Zielgröße nicht nachgewiesen werden.

Die beschriebene Abnahme der Liposomendurchmesser mit steigendem PG-Anteil ist daher wahrscheinlich auf die steigende Anzahl negativer Ladungsträger in der Membran zurückzuführen.

Nachfolgend wird der Einfluss steigender PG-Anteile auf das Zetapotenzial untersucht.

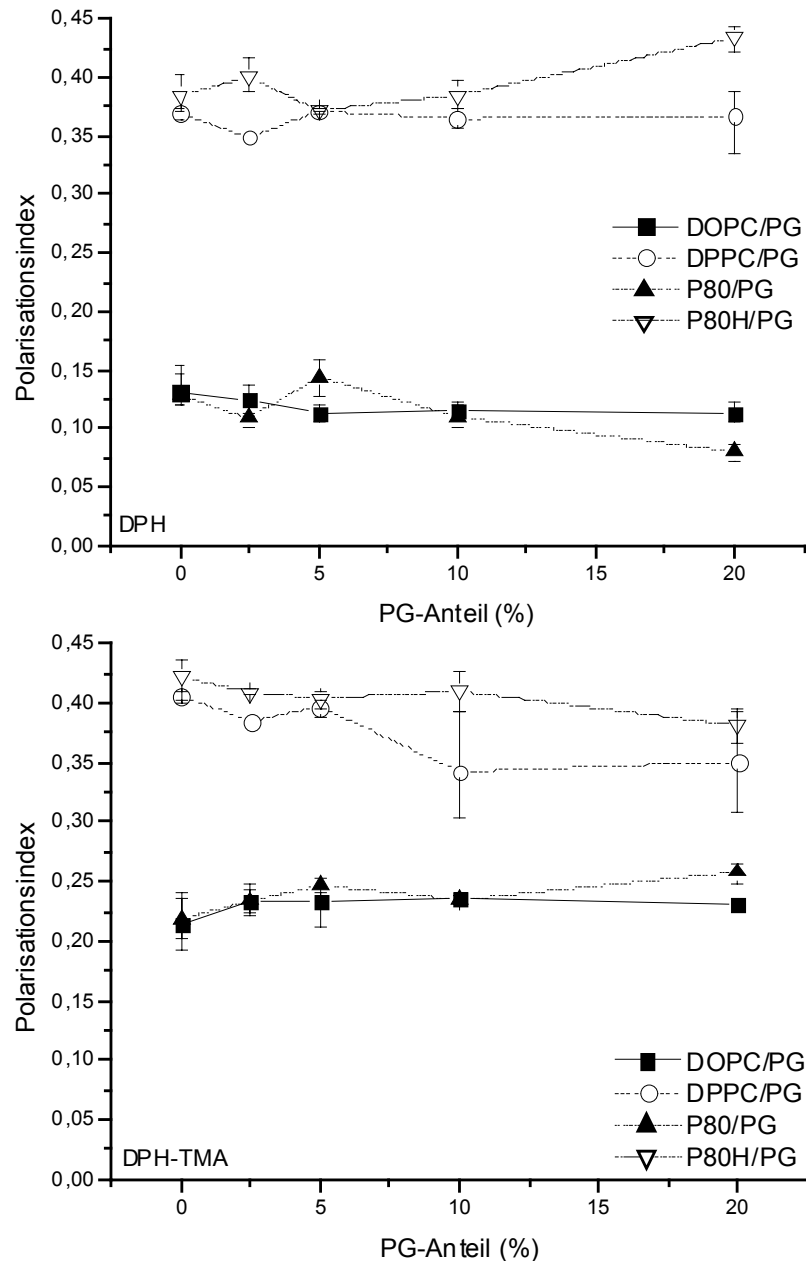


Abb. 12 Polarisationsindex der Fluoreszenzmarker DPH bzw. DPH-TMA in Abhängigkeit vom PG-Anteil in der Membran von Liposomen mit den Lipidgrundlagen DOPC, DPPC, P80 bzw. P80H ($\bar{x} \pm R$, $n = 3$)

Durch den Zusatz von PG zu den Lipidgrundlagen wird die Dichte negativer Ladungsträger auf der Oberfläche von Liposomen erhöht. Die Folge ist ein verringertes Nernst- und Zetapotenzial und daher eine verbesserte Stabilität der Formulierung. Hohe Elektrolytkonzentrationen im Messmedium ziehen eine Kompression der diffusen Schicht nach sich, wodurch die Unterschiede der Zetapotenziale kleiner werden. Um vorhandene Zetapotenzialunterschiede

optimal zu detektieren, wurden daher vergleichende Messungen im Originaldispersionsmedium ($14,6 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-1}$) und in Wasser durchgeführt, dessen Leitfähigkeit mit NaCl-Lösung auf einen Wert von $50 \text{ }\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ eingestellt wurde. Die Verwendung von Leitfähigkeitswasser zieht eine Ausdehnung der diffusen Schicht nach sich, wodurch die Unterschiede der Zetapotenziale stärker ausgeprägt vorliegen. Die Abschätzung der Stabilität erfolgte nach der unter 7.5.3 aufgeführten Tabelle.

Die im Originaldispersionsmedium gemessenen Zetapotenziale der Liposomen ohne PG-Zusatz weisen die hergestellten Systeme als sehr instabile Formulierungen aus, bei denen mit einer Ausflockung gerechnet werden muss (Abb. 13). Liposomen aus partialsynthetischen Grundlagen (DOPC, DPPC), bei denen Begleitsubstanzen wie z.B. Phosphatidylethanolamin fehlen, weisen erwartungsgemäß ein höheres Zetapotenzial auf als Liposomen aus den natürlichen Sojalipiden (P80, P80H). Der Zusatz von PG führt im Originaldispersionsmedium zwar zu einer kontinuierlichen Absenkung des Zetapotenzials der Liposomen, jedoch erfolgt kein Übergang zu Werten, ab denen mit einer mäßigen bis mittleren Stabilität gerechnet werden kann ($< -30 \text{ mV}$).

Durch die Vermessung der Formulierungen in Leitfähigkeitswasser wurden die Veränderungen der Oberflächenladungen durch den Zusatz von PG deutlich. Liposomen aus DOPC und DPPC ohne Zusatz von PG weisen im Leitfähigkeitswasser die gleichen Zetapotenziale auf wie im Originaldispersionsmedium. Durch den Zusatz von 2,5 % PG wird im Gegensatz zum Originaldispersionsmedium eine Absenkung des Zetapotenzials um 15 bis 20 mV erreicht. Die Erhöhung des PG-Anteils um weitere 2,5 % führt ebenfalls zu einer deutlichen Absenkung des Zetapotenzials. Während die Erhöhung des PG-Anteils auf 10 % bzw. 20 % im Leitfähigkeitswasser nur noch geringfügige Änderungen nach sich zieht, kommt es im Originaldispersionsmedium zu einer weiteren Absenkung des Zetapotenzials.

Der Einbau von PG in die Membranen von Liposomen aus P80 bzw. P80H führt im Vergleich zu Liposomen aus DOPC und DPPC nur zu einer geringen Abnahme des Zetapotenzials ($< 20 \text{ mV}$). Dagegen sind die Absolutwerte des Zetapotenzials aufgrund der in den Grundlagen vorhandenen negativ geladenen Begleitsubstanzen geringer. Mit und ohne den Zusatz von PG ist für diese Zubereitungen bei einer möglichen Lagerung in Leitfähigkeitswasser eine mäßige bis geringe Stabilität zu erwarten.

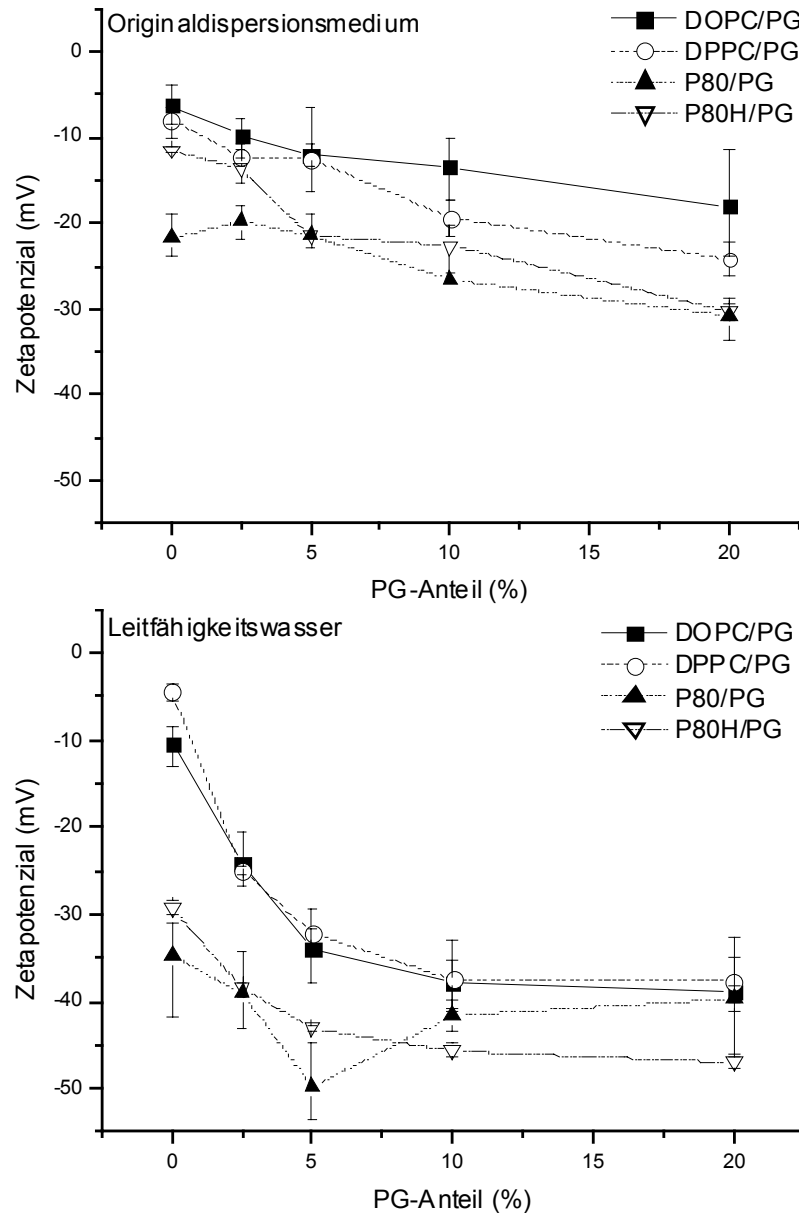


Abb. 13 Zetapotenzial in Abhängigkeit von der Konzentration an PG in der Membran von Liposomen aus den Grundlagen DOPC, DPPC, P80, P80H bestimmt im Originaldispersionsmedium und in 50 μ S-Leitfähigkeitswasser ($\bar{x} \pm R$, $n = 3$)

Aus dem steigenden Zusatz von Phosphatidylglycerol zur Lipidmembran von DOPC-, DPPC- und P80H-Liposomen resultieren Liposomen mit abnehmenden Durchmessern und sinkenden Zetapotenzialen. Ob ein Zusammenhang zwischen den beiden Größen besteht, sollte durch eine lineare Regressionsanalyse mit dem Zetapotenzial als Einflussgröße und dem Liposomendurchmesser als Zielgröße überprüft werden. Die Bestimmung ergab Korrelationskoeffizienten von 0,885 bis 0,962, durch die eine Korrelation dieser Faktoren miteinander belegt

wird. Der Durchmesser von P80-Liposomen erwies sich dagegen als unabhängig vom Zetapotenzial.

Grundsätzlich gilt: je höher der Anteil an PG, desto niedriger das Zetapotenzial und um so besser die zu erwartende Stabilität der Zubereitung. Für die folgenden Untersuchungen wurde der Anteil an PG in den Membranen der Liposomen aus den partialsynthetischen Lipiden auf 5 % für DOPC bzw. 10 % für DPPC festgelegt. Bei den Grundlagen P80H und P80 wurde auf einen Zusatz von PG verzichtet. Der Gehalt wurde als Kompromiss aus den erhaltenen Daten, dem relativ hohen Preis von PG und der nicht vorhandenen Notwendigkeit zur Lagerung der Liposomen über sehr lange Zeiträume festgelegt.

Zur näheren Charakterisierung der Bedeutung von einzelnen Bestandteilen der Liposomengrundlage für das Zetapotenzial von Liposomen wurden die verschiedenen Formulierungen in Abhängigkeit vom pH-Wert des Messmediums vermessen (Abb. 14). Als Messmedium dienten Britton-Robinson-Puffer mit definierten pH-Werten. Der Vorteil dieser Zetapotenzial-pH-Profile gegenüber Ein-Punkt-Messungen besteht in der Erfassung sämtlicher auf der Oberfläche dissoziierbarer Gruppen in Abhängigkeit der pH-Werte.

Aufgrund der zurückgedrängten Dissoziation der Phosphatgruppe und der positiv geladenen Aminogruppe des Phosphatidylcholins nehmen die Zubereitungen der Lipidgrundlagen DOPC/PG, DPPC/PG und P80H/PG bei einem pH-Wert von 2,5 positive Zetapotenzialwerte an. Ausgenommen sind die Zubereitungen mit einem PG-Anteil von 20 %, deren Zetapotenziale durch die negative Ladung des PG dominiert werden und daher negativ sind.

Die Zetapotenziale der genannten Formulierungen nehmen in der Reihenfolge der PG-Anteile 0; 2,5; 5,0; 10,0 und 20,0 % ab. Die Formulierungen aus der Lipidgrundlage P80 weisen bei einem pH-Wert von 2,5 und einem PG-Anteil von 0 bis 5 % ein schwach positives Zetapotenzial auf. Für Liposomen mit einem PG-Anteil von 10 % bzw. 20 % wurde dagegen bei gleichem pH-Wert ein negatives Zetapotenzial bestimmt. Die zurückgedrängte Dissoziation der Phosphatgruppe und positive Ladung der Aminogruppe wird in dieser Formulierung im Gegensatz zu den Formulierungen aus DOPC/PG, DPPC/PG und P80H/PG durch negativ geladene Bestandteile der Membranen teilweise bzw. vollständig kompensiert. Nach Herstellerangaben sind in der Grundlage 1,9 % Kepheline (z.B. Phosphatidylserin, Phosphatidyletha-

nolamin) enthalten und weitere nicht näher quantifizierte bzw. spezifizierte Bestandteile. Es ist daher davon auszugehen, dass neben Phosphatidylserin weitere negativ geladene Bestandteile enthalten sind, die zu der Absenkung des Zetapotenzials bei diesem pH-Wert beitragen.

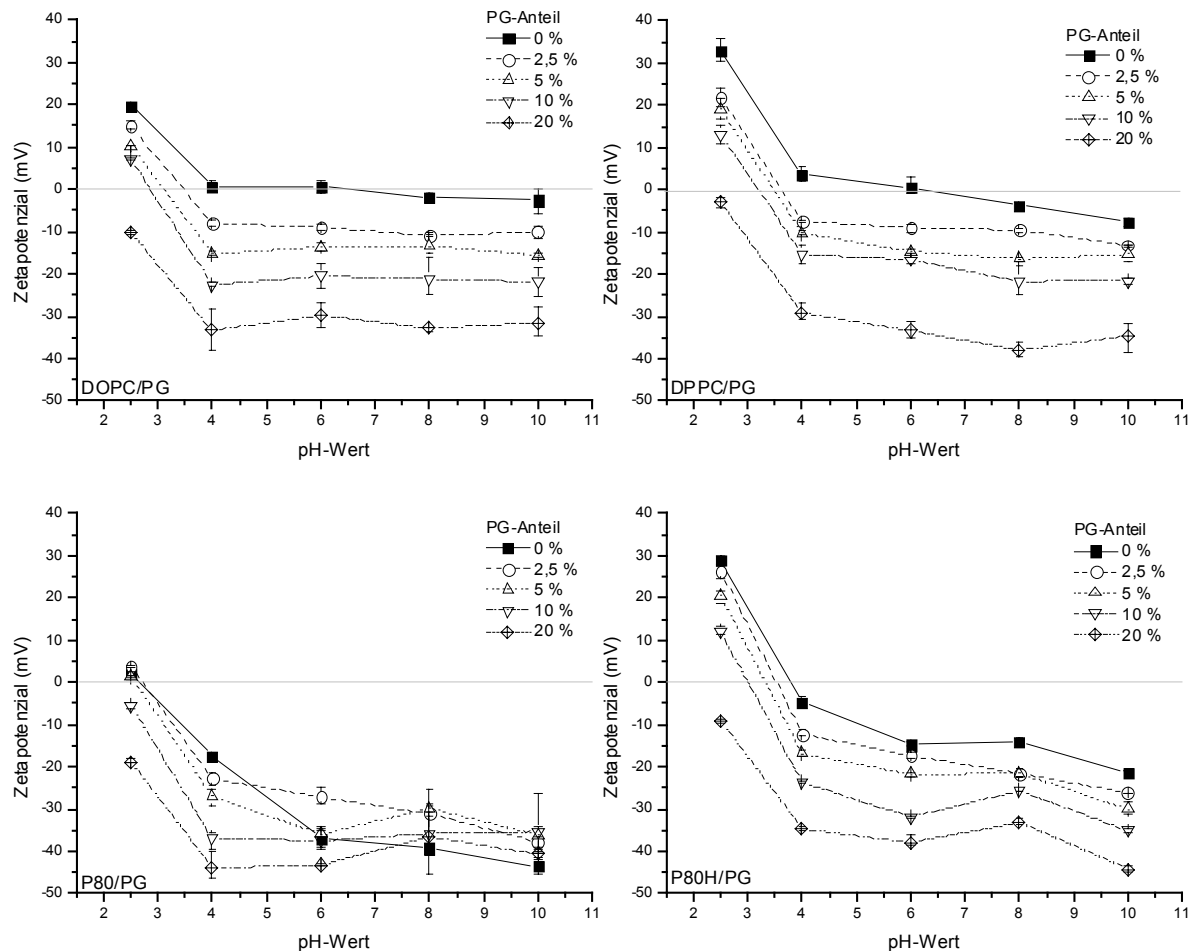


Abb. 14 Zetapotenzial von Liposomen aus den Grundlagen DOPC/PG, DPPC/PG, P80/PG, P80H/PG in Abhängigkeit vom pH-Wert des Messmediums ($\bar{x} \pm R$, $n = 3$)

Die Erhöhung des pH-Werts im Messmedium von 2,5 auf 4,0 zieht in allen Formulierungen eine ausgeprägte Absenkung des Zetapotenzials nach sich, die auf die Dissoziation der Phosphatgruppe der Phosphatidylcholine zurückzuführen ist. Bei einer weiteren Erhöhung des pH-Werts verändern sich die Zetapotenziale der untersuchten Formulierungen uneinheitlich.

Das Zetapotenzial der Liposomen aus DOPC ohne PG-Zusatz ist in einem pH-Wert-Bereich von 4,0 bis 10,0 nur schwach geladen, woraus auf die Abwesenheit von dissoziierbaren Gruppen wie z.B. freien Fettsäuren geschlossen werden kann. Liposomen dieser Grundlage mit PG-Zusatz zeigen ein erniedrigtes Zetapotenzial, dessen Größe von der Konzentration an PG

in der Liposomenmembran abhängig ist und das oberhalb eines pH-Werts von 4,0 unabhängig von diesem verläuft.

Liposomen aus DPPC ohne PG-Zusatz zeigen ein mit steigendem pH-Wert geringfügig abnehmendes Zetapotenzial, das auf die Anwesenheit von dissoziierbaren Bestandteilen schließen lässt. Bei diesen handelt es sich wahrscheinlich um Palmitinsäure-Moleküle, die aus der während der Liposomenherstellung auftretenden Spaltung von DPPC in Palmitinsäure und Lysophosphatidylcholin hervorgehen. Der Zusatz von PG führt zu einer Abnahme der Zetapotenziale, deren Werte sich mit den entsprechenden Zetapotenzialen der DOPC-Liposomen nahezu in Übereinstimmung befinden. Wie auch bei Liposomen aus der Grundlage DOPC verlaufen die Zetapotenzialprofile der DPPC-Liposomen oberhalb eines pH-Werts von 4,0 unabhängig von diesem. Das Ergebnis zeigt, dass das Zetapotenzial von DOPC- und DPPC-Liposomen maßgeblich durch den PG-Zusatz und nicht durch Begleitsubstanzen der Lipide geprägt wird.

Durch die Erhöhung des pH-Werts auf 6,0 nimmt das Zetapotenzial von Liposomen aus der Grundlage P80H/PG im Vergleich zu Liposomen aus DOPC/PG bzw. DPPC/PG stark ab. Daher kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass es zu einer Deprotonierung der vorhandenen Carboxyl- bzw. anderer funktioneller Gruppen kommt. Ähnlich wie bei der Grundlage DPPC ist zu vermuten, dass während der Hydratisierung der Lipidgrundlage die Lipide teilweise hydrolytisch gespalten werden. Daneben sind wahrscheinlich in dem vom Hersteller mit 25 % angegebenen, jedoch nicht näher spezifizierten Anteil an Begleitsubstanzen weitere Moleküle enthalten, die bei steigendem pH-Wert negative Ladungen tragen z.B. Phosphatidylserin, Phosphatidsäure und freie Fettsäuren. Der Zusatz von PG zur Lipidgrundlage führt im Vergleich zu DOPC/PG bzw. DPPC/PG nur zu einer geringen zusätzlichen Absenkung des Zetapotenzials.

Das Zetapotenzial von Liposomen aus der Grundlage P80 ist im Gegensatz zu den Zetapotenzialen der übrigen Formulierungen nur schwach positiv. Dieser Befund deutet auf einen großen Anteil an negativen Ladungsträgern in der Lipidmembran hin (s.o.). Ebenso wie bei den übrigen Liposomen-Formulierungen sinkt das Zetapotenzial bei der Erhöhung des pH-Werts von 2,5 auf 4,0 aufgrund der Dissoziation der Phosphatgruppe stark ab. Im Vergleich zu den Liposomen mit anderen Grundlagen kommt es aber bei einer Erhöhung des pH-Wertes von 4,0 auf 6,0 zu dem größten Abfall des Zetapotenzials, der wahrscheinlich auf die Disso-

ziation von freien Fettsäuren in der Liposomenmembran zurückzuführen ist. Die Erhöhung des PG-Anteils in der Lipidmembran von P80-Liposomen führt nur bis zu einem pH-Wert von 4,0 zu einer generellen Absenkung des Zetapotenzials. Ab einem pH-Wert von 7,0 sind die Zetapotenziale der Liposomen mit PG-Zusatz größer als die Zetapotenziale der Liposomen ohne PG-Zusatz. Dieses Ergebnis spricht dafür, dass die in der Membran vorhandenen Ladungsträger mehr als eine dissoziierbare funktionelle Gruppe aufweisen. Diese Annahme wird dadurch belegt, dass der Austausch von Teilen der Lipidgrundlage gegen PG, das nur eine negative Ladung trägt, nicht zu einer Abnahme des Zetapotenzials, sondern zu einer Zunahme führt.

3.1.2.2 Herstellung von Liposomen mit variierendem Cholesterol-Gehalt in der Lipiddoppelmembran

Im folgenden Versuch sollte der Einfluss von steigenden Cholesterolanteilen auf die Größe, den Polydispersitätsindex, das Zetapotenzial und die Membranviskosität von extrudierten Liposomen aus den Lipidgrundlagen DOPC/PG/CH; DPPC/PG/CH, P80/CH und P80HCH untersucht werden. Dazu wurden Liposomen mit einem Cholesterolanteil von 0, 10, 20, 30, 40 und 50 % (mol/mol) in der Lipiddoppelmembran nach der unter 6.3.1 beschriebenen Methode hergestellt. Zur Herstellung von unilamellaren Liposomen wurden multilamellare Liposomen durch einen Membranfilter mit einer Porengröße von 200 nm in 25 Zyklen extrudiert. Der Gesamtgehalt der Lipide betrug 5 %.

Cholesterol selbst ist nicht in der Lage, Doppelmembranen auszubilden. Es kann aber in großem Umfang in Phospholipid-Membranen integriert werden und dadurch Veränderungen in den Membraneigenschaften verursachen. Die amphiphilen Eigenschaften des Cholesterols sind für eine Ausrichtung der Hydroxylgruppe in Richtung der polaren Kopfgruppen und der aliphatischen Kette in Richtung der Acylketten der Phospholipide verantwortlich. Die 3 β -Hydroxylgruppe befindet sich in der Membran auf gleicher Höhe mit den Carboxylresten der Esterbindungen der Phospholipide. Das starre Grundgerüst des Cholesterols, das sich parallel zu den ersten zehn Kohlenstoffatomen der Acylketten der Phospholipide befindet, schränkt

die Beweglichkeit dieser Kohlenstoffatome stark ein, fördert aber gleichzeitig die Beweglichkeit der terminalen Kohlenstoffatome [226]. Der beschriebene Effekt führt zu einer Erhöhung der Mikroviskosität der Lipiddoppelmembranen. Die Mikroviskosität liposomaler Membranen kann als Stabilitätsparameter herangezogen werden, da eine erhöhte Festigkeit der Phospholipid-Doppelschichten der Fusion von Liposomen entgegenwirkt. Zu einer Erhöhung der Mikroviskosität von Membranen mit steigendem Cholesterolanteil kommt es jedoch nur bei Vesikeln aus Lipiden mit niedrigen Phasenübergangstemperaturen. Bei Vesikeln, deren Phospholipid-Doppelschichten aufgrund höherer Ordnungsgrade hohe Phasenübergangstemperaturen aufweisen, wird die Membranviskosität durch Cholesterol unterhalb der Phasenübergangstemperatur vermindert und oberhalb erhöht [230-233].

Die Veränderung des Cholesterolanteils in den Lipidmembranen von Liposomen erlaubt daher die Herstellung von Vesikeln mit unterschiedlichen Membranviskositäten. Die Möglichkeit zur Herstellung solcher Vesikel ist für die Untersuchung von Veränderungen der Penetrationsbarriere der Haut durch epikutan applizierte Liposomen mit rigiden und fluiden Lipidmembranen von Bedeutung. Für die Liposomenherstellung werden üblicherweise Cholesterol-Konzentrationen zwischen 30 und 50 mol% eingesetzt [234 - 236].

Herstellung von multilamellaren Liposomen

Ausgangspunkt zur Herstellung von SUV, LUV und anderen Liposomen mit reduzierter Lamellenzahl und definiertem Durchmesser sind meist multilamellare Liposomen. Diese entstehen durch die Hydratisierung von Lipiden bzw. Lipidmischungen mit dem Dispersionsmedium (vgl. 5.3.1). *Nachfolgend sollte die Größe der aus der Hydratisierung der Lipidgrundlagen resultierenden multilamellaren Liposomen in Abhängigkeit von dem Cholesterolgehalt ihrer Phospholipiddoppelmembranen untersucht werden.* Bei den untersuchten multilamellaren Liposomen wurden zur Reduzierung der Lamellarität fünf Frier-Tau-Zyklen nach der Hydratisierung durchgeführt. Anschließend wurden die Formulierungen eine Minute lang mit einem Minishaker intensiv durchmischt, um die Vesikelgröße zu reduzieren. Dadurch sollte bei der nachfolgenden Extrusion der multilamellaren Liposomen das Vestopfen einzelner Poren der Membranfilter des LiposoFast-Membranextruders mit besonders großen Liposomen

verhindert werden.

Aufgrund der erwarteten Vesikelgrößen im Mikrometerbereich wurden die multilamellaren Liposomen 24 Stunden nach der Herstellung mit einem Laserdiffraktometer (LS) und nicht mit einem Photonenkorrelationsspektrometer vermessen (vgl. 5.2.2 und 5.2.5).

Die Vermessung der Liposomen mit Hilfe des Laserdiffraktometers ergab deutliche Unterschiede zwischen Liposomen mit fluiden (DOPC/CH/PG, P80/CH) und rigiden (DPPC/CH/PG, P80H/CH) Lipidmembranen (Tab. 2). Die Auswertung der Vesikelgrößen nach ihren Volumenanteilen zeigt, dass 50 % der Liposomen mit fluiden Membranen kleiner waren als $0,4\ \mu\text{m}$ und 99 % der Vesikel Durchmesser von weniger als $2,4\ \mu\text{m}$ hatten. Die Durchmesser von Liposomen mit rigiden Membranen waren dagegen deutlich größer. Der Durchmesser von 50 % der Liposomen lag in einem Bereich von $7,7$ bis $16\ \mu\text{m}$. Unterschiede ergaben sich auch zwischen den Vesikeln aus DPPC/CH/PG und P80H/CH hinsichtlich dem Durchmesser bei einem Volumenanteil von 99 %. Während die Formulierungen aus DPPC/CH/PG mit einem Cholesterolanteil von weniger als 20 % sehr große Vesikel mit Durchmessern in einem Bereich von 135 bis $166\ \mu\text{m}$ enthielten, waren in Formulierungen aus P80H/CH 99 % der Vesikel kleiner als $66\ \mu\text{m}$.

Die Unterschiede der Durchmesser von Liposomen mit fluiden und rigiden Membranen sind auf die Rigidität der Membranen und die damit notwendige Energie zur Zerteilung der Membranen zurückzuführen.

Eine Abhängigkeit der mittleren Vesikeldurchmesser vom Cholesterolgehalt der Membranen konnte jedoch nicht festgestellt werden. Eine Ausnahme bilden Vesikel mit der Lipidgrundlage DOPC/CH/PG, bei denen ein Cholesterolgehalt von 50 % zu einer erheblichen Zunahme der Vesikeldurchmesser führte.

Tabelle 2 Größen von multilamellaren Liposomen mit den Lipidgrundlagen DOPC/CH/PG, DPPC/CH/PG, P80/CH und P80H/CH in Abhängigkeit vom Cholesterolanteil in der Lipidmembran

CH-Anteil	Anteil (Vol. %)	DOPC/CH/PG	DPPC/CH/PG	P80/CH	P80H/CH
		Partikeldurchmesser $\mu\text{m} <$			
0	10	$0,084 \pm 0,004$	$4,897 \pm 0,155$	$0,088 \pm 0,002$	$3,166 \pm 0,003$
	50	$0,254 \pm 0,026$	$15,397 \pm 1,452$	$0,269 \pm 0,010$	$8,123 \pm 0,057$
	90	$1,664 \pm 0,119$	$89,520 \pm 10,647$	$1,523 \pm 0,077$	$29,503 \pm 0,422$
	95	$1,990 \pm 0,050$	$124,50 \pm 14,27$	$1,889 \pm 0,039$	$35,777 \pm 0,319$
	99	$2,374 \pm 0,023$	$165,50 \pm 19,60$	$2,307 \pm 0,026$	$43,717 \pm 0,177$
10	10	$0,090 \pm 0,004$	$4,408 \pm 0,048$	$0,086 \pm 0,002$	$3,400 \pm 0,005$
	50	$0,281 \pm 0,015$	$11,623 \pm 0,563$	$0,257 \pm 0,012$	$8,611 \pm 0,044$
	90	$1,300 \pm 0,375$	$62,347 \pm 6,565$	$1,217 \pm 0,104$	$28,847 \pm 0,424$
	95	$1,899 \pm 0,042$	$95,037 \pm 6,225$	$1,796 \pm 0,020$	$35,277 \pm 0,378$
	99	$2,320 \pm 0,025$	$134,733 \pm 5,604$	$2,244 \pm 0,015$	$43,603 \pm 0,164$
20	10	$0,089 \pm 0,002$	$4,630 \pm 0,082$	$0,086 \pm 0,0007$	$4,192 \pm 0,012$
	50	$0,279 \pm 0,006$	$10,947 \pm 0,067$	$0,250 \pm 0,006$	$11,080 \pm 0,293$
	90	$1,224 \pm 0,186$	$30,387 \pm 1,082$	$1,551 \pm 0,027$	$29,727 \pm 1,780$
	95	$1,798 \pm 0,030$	$39,800 \pm 1,666$	$1,913 \pm 0,013$	$39,703 \pm 3,230$
	99	$2,241 \pm 0,026$	$54,727 \pm 1,941$	$2,327 \pm 0,008$	$56,770 \pm 2,582$
30	10	$0,098 \pm 0,012$	$4,804 \pm 0,072$	$0,087 \pm 0,003$	$4,217 \pm 0,038$
	50	$0,319 \pm 0,037$	$12,070 \pm 0,135$	$0,257 \pm 0,018$	$9,932 \pm 0,018$
	90	$1,666 \pm 0,116$	$35,017 \pm 1,006$	$1,580 \pm 0,090$	$26,800 \pm 0,477$
	95	$1,969 \pm 0,065$	$46,080 \pm 1,560$	$1,935 \pm 0,039$	$36,453 \pm 0,950$
	99	$2,356 \pm 0,034$	$66,107 \pm 1,696$	$2,340 \pm 0,023$	$63,920 \pm 1,537$
40	10	$0,089 \pm 0,0004$	$4,763 \pm 0,004$	$0,098 \pm 0,005$	$5,011 \pm 0,031$
	50	$0,266 \pm 0,010$	$11,670 \pm 0,040$	$0,305 \pm 0,015$	$11,727 \pm 0,038$
	90	$1,674 \pm 0,066$	$29,770 \pm 0,586$	$1,737 \pm 0,016$	$29,410 \pm 1,324$
	95	$1,975 \pm 0,032$	$40,443 \pm 1,641$	$2,008 \pm 0,010$	$40,773 \pm 2,432$
	99	$2,362 \pm 0,019$	$59,587 \pm 3,480$	$2,382 \pm 0,004$	$65,550 \pm 3,311$
50	10	$11,138 \pm 1,401$	$4,465 \pm 0,041$	$0,116 \pm 0,002$	$3,823 \pm 0,103$
	50	$125,46 \pm 16,11$	$10,940 \pm 0,046$	$0,397 \pm 0,001$	$7,716 \pm 0,051$
	90	$328,86 \pm 49,47$	$26,087 \pm 0,545$	$1,812 \pm 0,006$	$17,320 \pm 0,750$
	95	$381,20 \pm 60,12$	$33,093 \pm 1,106$	$2,050 \pm 0,006$	$23,487 \pm 1,449$
	99	$466,76 \pm 94,82$	$52,457 \pm 0,446$	$2,396 \pm 0,002$	$35,733 \pm 1,947$

Herstellung von unilamellaren Liposomen

Aus den multilamellaren Liposomen sollten in einem weiteren Schritt unilamellare Liposomen hergestellt und die vom Cholesterolgehalt abhängigen Veränderungen der Größe, des Polydispersitätsindex und Zetapotenzial sowie der Membranviskosität untersucht werden.

Mit steigenden Cholesterolanteilen in den Lipiddoppelmembranen von DOPC/CH/PG-, DPPC/CH/PG- und P80/CH-Liposomen resultierten aus der Extrusion der multilamellaren Ausgangsvesikel Liposomen mit zunehmenden Durchmessern (Abb. 15). Dieser Effekt von Cholesterol auf die Größe von Phospholipidliposomen wurde bereits in der Literatur beschrieben [237].

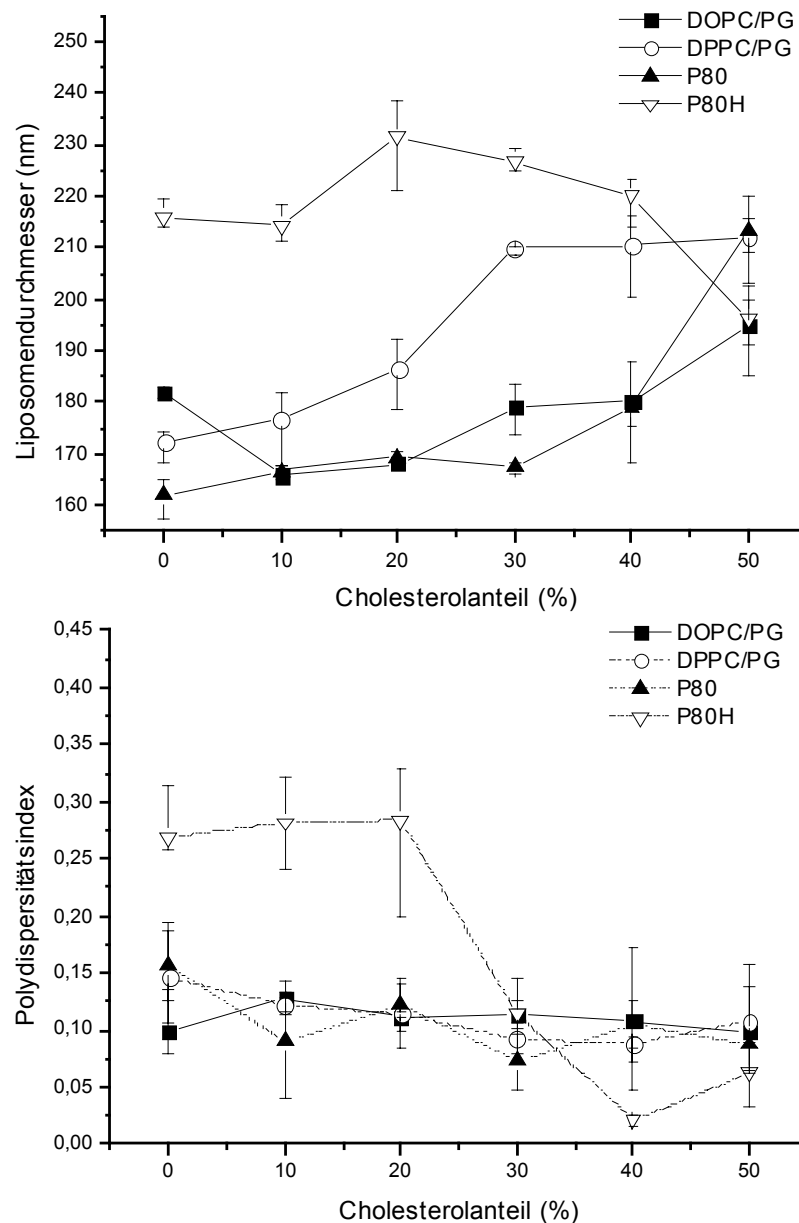


Abb. 15 Liposomendurchmesser und Polydispersitätsindex in Abhängigkeit von der Konzentration an CH in der Membran von Liposomen aus den Grundlagen DOPC/CH/PG, DPPC/CH/PG, P80/CH bzw. P80H/CH ($\bar{x} \pm R$, $n = 3$)

Dagegen zieht die Erhöhung des Cholesterolanteils in der Lipiddoppelmembran von P80H-Liposomen nur bis zu einem Anteil von 20 % einen zunehmenden Liposomendurchmesser nach sich. Mit weiter steigenden Anteilen von Cholesterol sinkt der Durchmesser der extrudierten Liposomen ab. Dieses Ergebnis wird darauf zurückgeführt, dass durch den Zusatz von Cholesterol die Ordnung innerhalb der Lipidmembran gestört wird und es wahrscheinlich gleichzeitig zu einer Abnahme der Mikroviskosität der Lipidmembranen kommt. Dies führt zu einer verbesserten Extrusionsfähigkeit der Vesikel unterhalb ihrer Phasenübergangstemperatur, die aufgrund der fehlenden Möglichkeit zur Temperierung des LiposoFast-Membranextruders während der Extrusion nicht überschritten werden kann. Durch die erhöhten Strömungsgeschwindigkeiten kommt es zu einer früheren Abtrennung der SUV von den MLV und damit zu kleineren Vesikeldurchmessern.

Die verbesserte Extrusion der Vesikel mit einem Cholesterolgehalt von mehr als 20 mol% führt neben der Abnahme der Vesikelgrößen zu einer engen Vesikelgrößenverteilungsbreite. Dagegen bleibt der Polydispersitätsindex von Liposomen mit den Grundlagen DOPC/CH/PG, DPPC/CH/PG, P80/CH durch Veränderungen des Cholesterolanteils nahezu unbeeinflusst.

Messungen des Zetapotenzials ergaben, dass das Zetapotenzial von DOPC/CH/PG-, DPPC/CH/PG- und P80H/CH-Liposomen mit steigendem Cholesterolanteil geringfügig abnimmt, während das Zetapotenzial von Liposomen aus der Grundlage P80 durch den Cholesterolzusatz kaum verändert wird (Abb. 16).

Die Bestimmung der Polarisationsindizes von DPH und DPH-TMA in Liposomen bestätigt nur teilweise die in der Literatur beschriebenen Effekte von Cholesterol auf die Mikroviskosität der Phospholipiddoppelmembranen (s.o.). Durch die Erhöhung der Cholesterolkonzentration in Liposomen aus Lipidgrundlagen mit niedrigen Phasenübergangstemperaturen (DOPC/CH/PG; P80/CH) werden sowohl die Polarisationsindizes von DPH-TMA als auch die von DPH erhöht (Abb 17).

Die Zunahme der P-Werte von DPH-TMA wird durch die Einschränkung der Mobilität der ersten zehn Kohlenstoffatome der Acylkette der Phospholipide durch Cholesterol [226] und die dadurch sinkende Mobilität des Fluoreszenzmarkers hervorgerufen. Dagegen finden sich in der Literatur Hinweise auf eine mit steigendem Cholesterolanteil zunehmende Beweglichkeit der terminalen Kohlenstoffatome der Phospholipide. In der Folge sollten mit steigendem Cholesterolanteil abnehmende P-Werte von DPH registriert werden. Da sich die

Membranen aus DOPC/CH/PG bzw. P80/CH aufgrund der Struktur der Phospholipide bei 32 °C im Zustand der Flüssig-Phase und damit in einem ungeordneten Zustand befinden, ist eine weitere Fluidisierung durch den Cholesterol-Zusatz unwahrscheinlich. Vielmehr belegen die steigenden P-Werte von DPH eine Abnahme der Mobilität des Fluoreszenzmarkers in dieser Region der Phospholipidmembran und damit eine Erhöhung der Viskosität seiner Mikroumgebung.

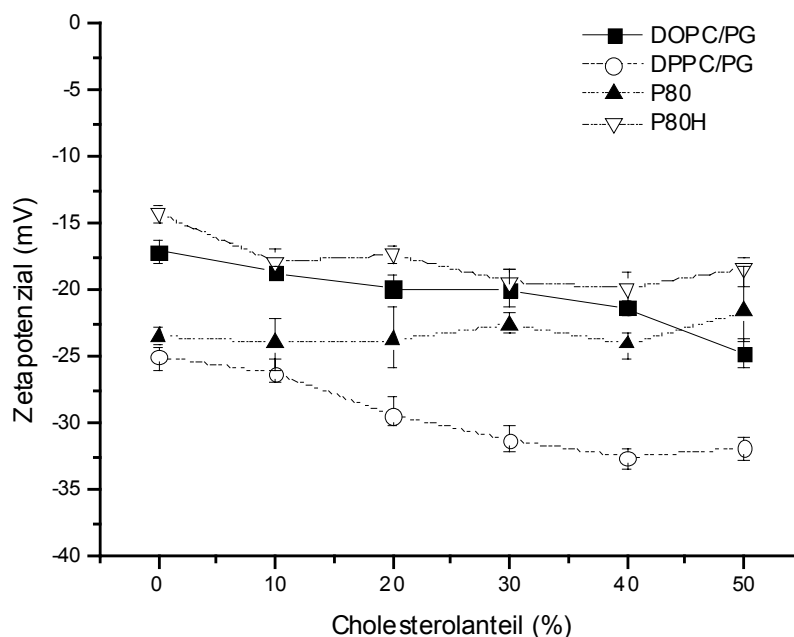


Abb. 16 Zetapotenzial im Originaldispersionsmedium in Abhängigkeit von der Konzentration an Cholesterol in der Membran von Liposomen aus den Grundlagen DOPC/CH/PG, DPPC/CH/PG, P80/CH bzw. P80H/CH ($\bar{x} \pm R$, $n = 3$)

In DPPC/CH/PG- und P80H/CH-Liposomen, deren Grundlagen hohe Phasenübergangstemperaturen aufweisen, führt der steigende Zusatz von Cholesterol zu abnehmenden Polarisationsindizes des Fluoreszenzmarkers DPH-TMA. Während in Liposomen mit der Grundlage P80H/CH auch der Polarisationsindex von DPH mit steigendem Cholesterolgehalt abnimmt, lässt sich für die Polarisationsindizes in Liposomen aus DPPC/CH/PG keine eindeutige Aussage ableiten. Die Ergebnisse bestätigen jedoch die in der Literatur vorliegenden Angaben. Danach führt die Erhöhung der Cholesterolkonzentration in Liposomen aus Lipiden mit hohen Phasenübergangstemperaturen und hohen Ordnungszuständen der Membranen unterhalb der Phasenübergangstemperatur zu einer Verminderung der Ordnungszustände und damit zu einer Abnahme der Mikroviskosität der Membranen [226, 233].

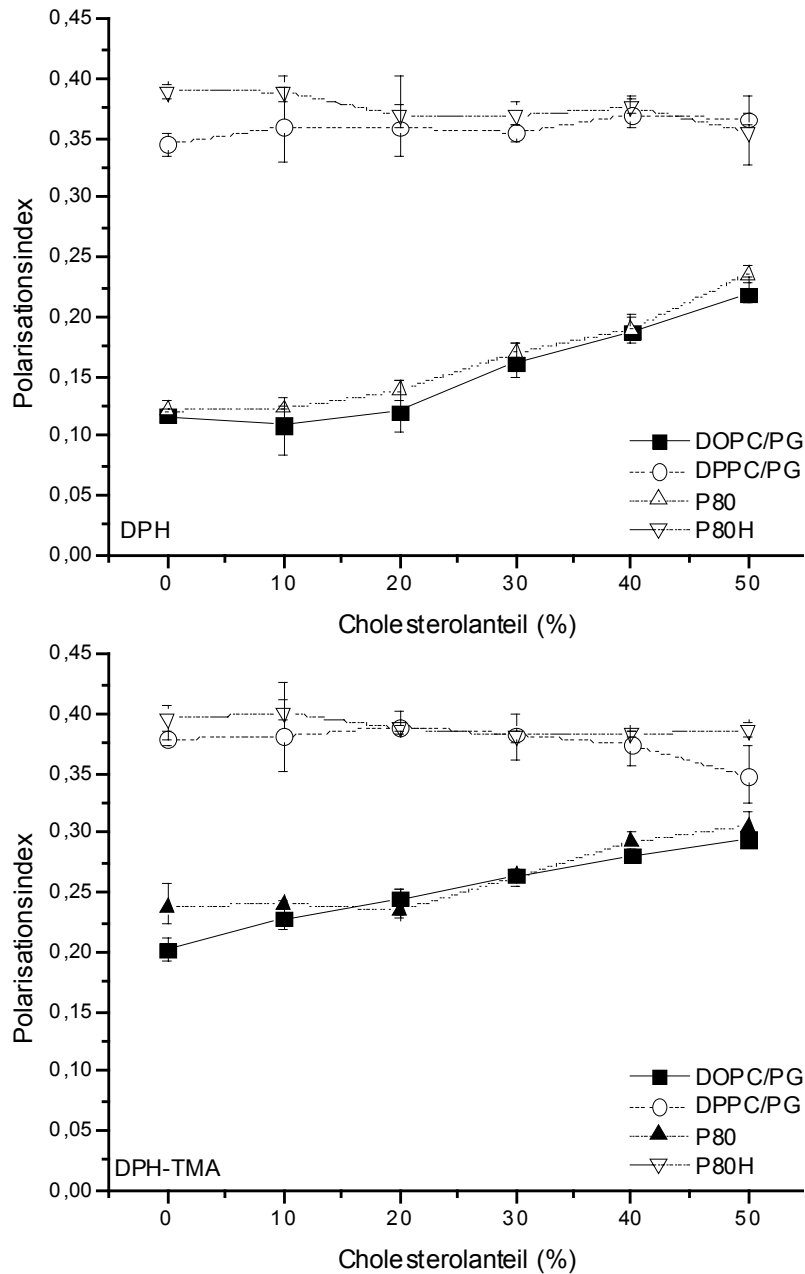


Abb. 17 Polarisationsindex der Fluoreszenzmarker DPH bzw. DPH-TMA in Abhängigkeit vom Anteil an CH in der Membran von Liposomen mit den Lipidgrundlagen DOPC/CH/PG, DPPC/CH/PG, P80/CH bzw. P80H/CH ($\bar{x} \pm R$, $n = 3$)

Aus den gemessenen Polarisationsindizes von DPH sollten nach der Methode von Shinitzky und Barenholz [238] Mikroviskositätswerte berechnet werden. Eine Umrechnung der P-Werte in Mikroviskositäten nach dieser Methode ist nur bedingt zulässig, da die Autoren in dem von ihnen entwickelten Modell von einer isotropen kugelförmigen Beweglichkeit des linearen DPH-Moleküls ausgehen [239]. Dennoch sollte das nur für DPH geeignete Modell herange-

zogen werden, um Aussagen zu dem Bereich zu machen, in dem sich die Mikroviskosität der Membranen befindet.

Die Umrechnung der P-Werte in Mikroviskositäten machte den Unterschied zwischen den Membranviskositäten der Liposomen aus DOPC/CH/PG bzw. P80/CH und DPPC/CH/PG bzw. P80H/CH deutlich (Abb. 18). In Abhängigkeit vom Cholesterolgehalt der Membranen wurden für DOPC/CH/PG- bzw. P80/CH-Liposomen, deren Membranen sich bei einer Messtemperatur von 32 °C in der Flüssig-Phase befinden, Werte zwischen etwa 70 bis 200 mPa·s bestimmt.

Für die Membranen von Liposomen aus DPPC/CH/PG bzw. P80H/CH, die sich bei 32 °C in der Gel-Phase befinden, wurden dagegen deutlich erhöhte Mikroviskositätswerte bestimmt. Diese liegen in Abhängigkeit vom Cholesterolgehalt zwischen etwa 580 und 1125 mPa·s. Die Ergebnisse machen deutlich, dass durch den Einbau von Cholesterol in Liposomenmembranen deren Mikroviskosität gezielt modifiziert werden kann.

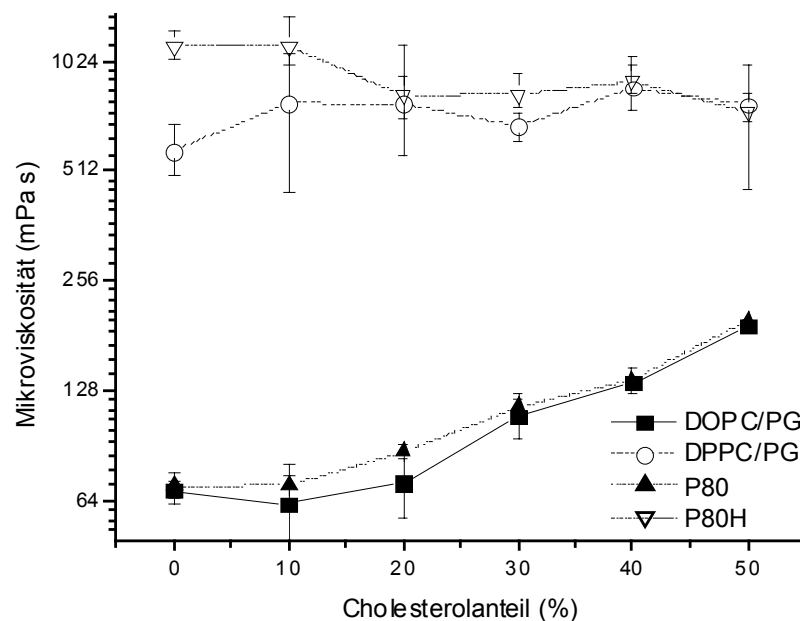


Abb. 18 Mikroviskosität von Liposomen mit den Lipidgrundlagen DOPC/CH/PG, DPPC/CH/PG, P80/CH bzw. P80H/CH in Abhängigkeit vom Anteil an Cholesterol in der Membran ($\bar{x} \pm R$, $n = 3$)

3.1.2.3 Herstellung von Liposomen unter Verwendung von Membranfiltern mit variierender Porengröße

Ziel der Herstellung von Liposomen für Penetrationsversuche ist es, Vesikel zu erhalten, die eine definierte Größe und eine möglichst enge Vesikelgrößenverteilungsbreite aufweisen. Darüber hinaus sollte es mit dem gewählten Herstellungsverfahren möglich sein, Liposomen mit unterschiedlichen Größen herzustellen, um Aussagen über die Bedeutung der Liposomengröße für den penetrationsverstärkenden Effekt von Liposomen treffen zu können. Durch den Einsatz von Membranfiltern mit variierenden Porendurchmessern können mit Hilfe des LiposoFast-Membranextruders Liposomen unterschiedlicher Größe hergestellt werden. Dabei muss der aus der Extrusion resultierende Vesikeldurchmesser nicht zwangsläufig mit dem Porendurchmesser der verwendeten Polycarbonatfilter übereinstimmen [240, 241]. *In den folgenden Versuchen sollte daher der Einfluss des Porendurchmessers der verwendeten Membranfilter sowie deren Anzahl auf die Größe, den Polydispersitätsindex und das Zetapotenzial von extrudierten Liposomen untersucht werden.* Zur Extrusion wurden Liposomenformulierungen mit den Lipidgrundlagen DOPC/CH/PG, DPPC/CH/PG, P80 bzw. P80H/CH eingesetzt. Von diesen wurden jeweils 0,5 ml in 25 Zyklen durch einen bzw. zwei Polycarbonat-Filter mit den Porengrößen 100, 200, 400 und 800 nm extrudiert.

Weiterhin sollte der Einfluss der Konzentration der Lipidgrundlage auf die Extrusionsfähigkeit sowie die Größe und den Polydispersitätsindex von Liposomen bestimmt werden.

In Abb. 19 sind die Größen von Liposomen in Abhängigkeit von der Porengröße des eingesetzten Membranfilters dargestellt. Die Vesikelgröße nimmt mit steigender Porengröße unter Verwendung sowohl von einem als auch von zwei Membranfiltern stetig zu. Die beste Steuerbarkeit der Vesikelgrößen wurde mit der Grundlage P80H/CH (6:4 mol/mol) erzielt, deren Liposomen mittlere Durchmesser von 145 nm bis 376 nm aufwiesen. Ähnlich verhielten sich Liposomen mit der Grundlage DPPC/CH/PG (4,0: 5,0: 0,5 mol/mol), deren Größen zwischen 131 nm und 307 nm lagen. Der maximal zu erwartende Durchmesser von DOPC/CH/PG-(6,5:0,5:3,0) bzw. P80-Liposomen wurde durch die Größe der zur Extrusion verwendeten multilamellaren Liposomen begrenzt, deren mittlere Durchmesser 319 nm bzw. 269 nm betrugen (s.o.). Durch die auftretenden Scherkräfte während der Extrusion wurden die Vesikelgrößen weiter vermindert, woraus maximale Durchmesser von 199 nm bzw. 180 nm

resultierten.

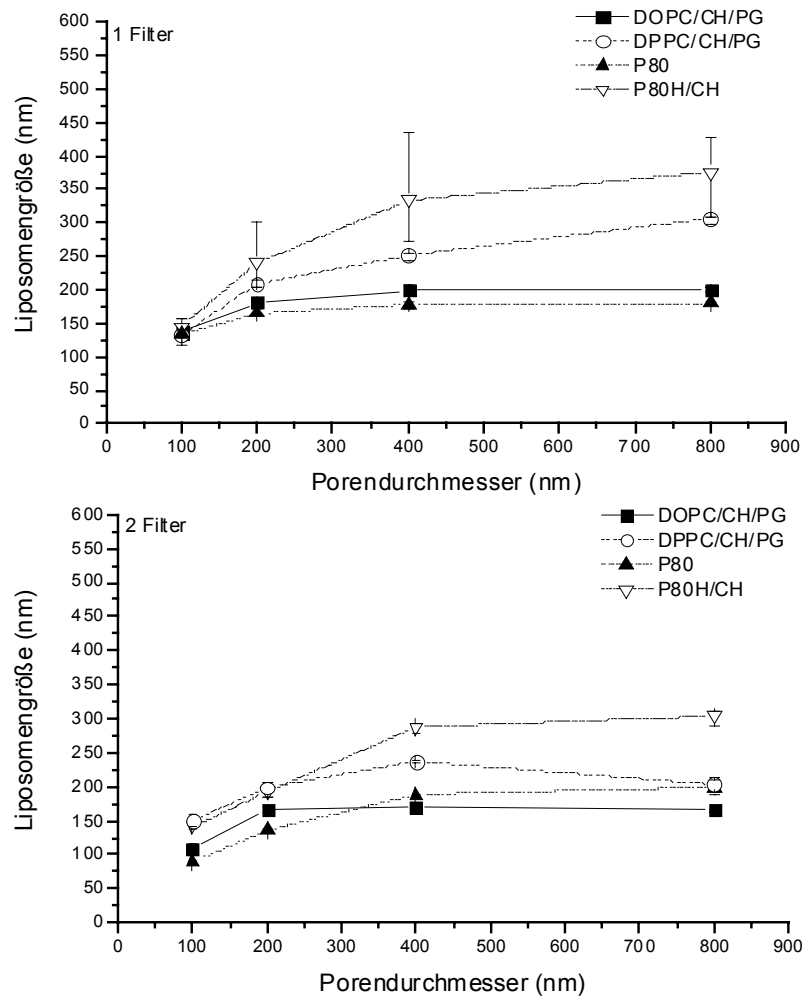


Abb. 19 Abhängigkeit der Größe von Liposomen mit verschiedenen Lipidgrundlagen von der Porengröße und der Anzahl (1 bzw. 2 Filter) zur Extrusion eingesetzter Membranfilter ($\bar{x} \pm R$, n = 3)

Durch die Verwendung von zwei Membranfiltern traten zusätzliche Scherkräfte auf, die zu einer Abnahme der mittleren Liposomendurchmesser aller Zubereitungen führten. Daneben wurde die Variationsbreite der Vesikelgrößen ebenfalls eingeschränkt. Die maximale Steuerbarkeit der Vesikelgrößen wurde unter Verwendung von zwei Membranfiltern ebenfalls für die Grundlage P80H/CH festgestellt, deren Liposomen hier Größen zwischen 141 nm und 303 nm in Abhängigkeit von der Porengröße des Filters annahmen.

Im Gegensatz zur Verwendung von nur einem Membranfilter konnte die Gefahr des Zerreißen des Filters während der Extrusion und damit der Verlust der Zubereitung durch die

Verwendung von zwei Membranfiltern deutlich verringert werden.

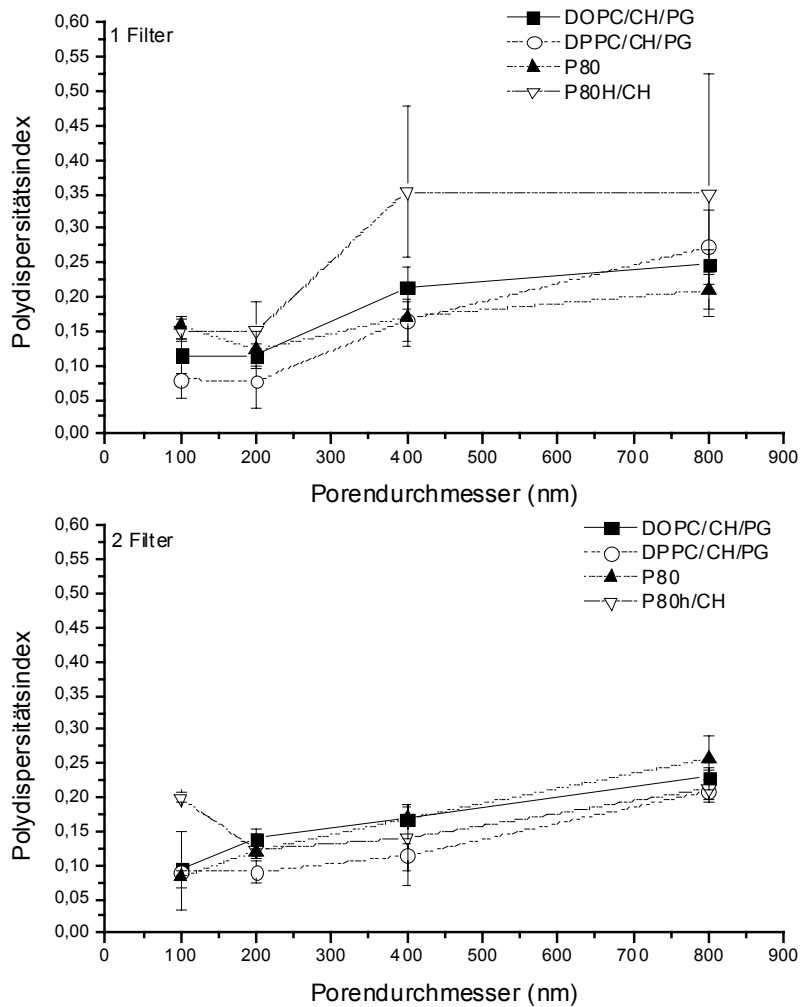


Abb. 20 Abhängigkeit des Polydispersitätsindex von Liposomen mit verschiedenen Lipidgrundlagen von der Porengröße und der Anzahl (1 bzw. 2 Filter) zur Extrusion eingesetzter Membranfilter ($\bar{x} \pm R$, $n = 3$)

Ein weiterer Vorteil der Extrusion von Liposomen durch zwei Membranfilter besteht in der deutlichen Reduktion der Polydispersitätsindizes und damit der Vesikelgrößenverteilungsbreiten der Liposomen in den untersuchten Formulierungen (Abb. 20). Dies gilt besonders für Liposomen mit den Lipidgrundlagen DPPC/CH/PG und P80H/CH, die durch Membranfilter mit Porengrößen von 400 bzw. 800 nm extrudiert wurden.

Nach Extrusion der DPPC/CH/PG- bzw. P80H/CH-Liposomen durch nur *einen* Membranfilter charakterisierten die zugehörigen Polydispersitätsindizes Zubereitungen mit einer breiten Verteilung der Vesikelgrößen. Dagegen wurden nach Extrusion durch *zwei*

Membranfilter mit einer Porengröße 400 nm bzw. 800 nm Polydispersitätsindizes bestimmt, die eine engen Vesikelgrößenverteilungsbreite belegen.

Sowohl die Anzahl als auch die Porengröße der zur Extrusion verwendeten Membranfilter hatten auf die gemessenen Zetapotenziale der Liposomen keinen erkennbaren Einfluss (Abb. 21).

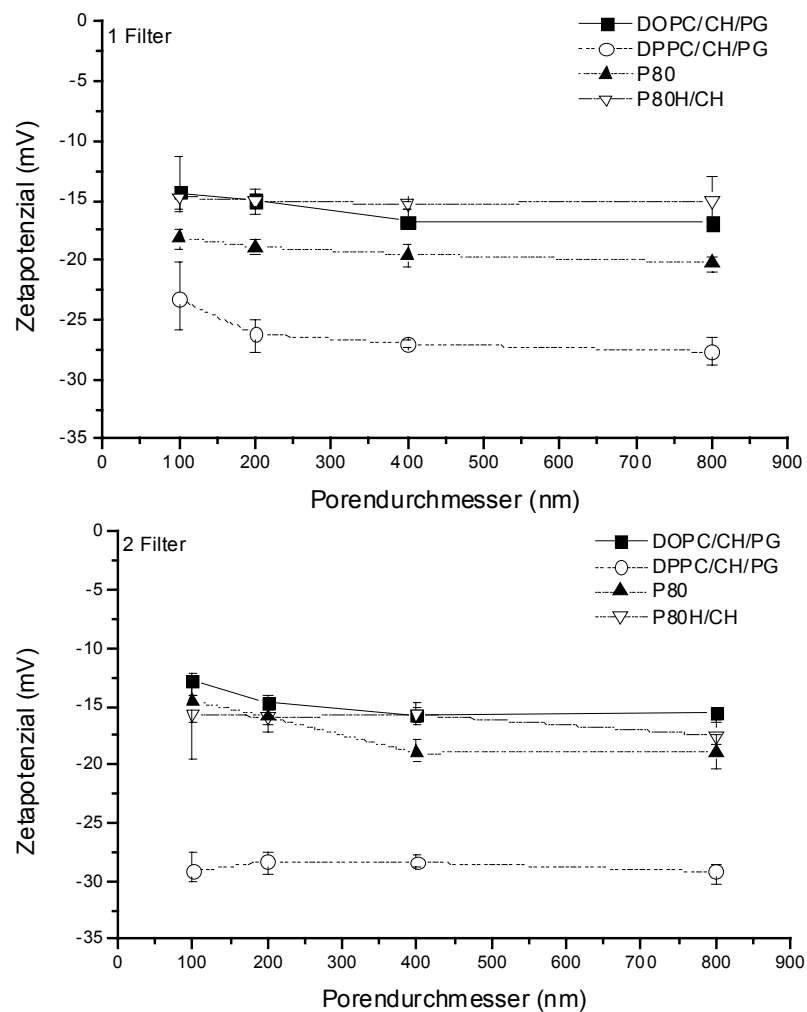


Abb. 21 Abhängigkeit des Zetapotenzials von Liposomen mit verschiedenen Lipidgrundlagen von der Porengröße und der Anzahl (1 bzw. 2 Filter) zur Extrusion eingesetzter Membranfilter ($\bar{x} \pm R$, $n = 3$)

Dieses gilt auch für die Polarisationsindizes der Fluoreszenzmarker DPH und DPH-TMA in den Liposomen, und dass, obwohl aufgrund der steigenden Liposomendurchmesser mit einer Abnahme der Krümmung der Membranen und damit mit einer Abnahme der Membranspannung und zunehmenden Beweglichkeit der Lipide gerechnet worden war (Abb. 22).

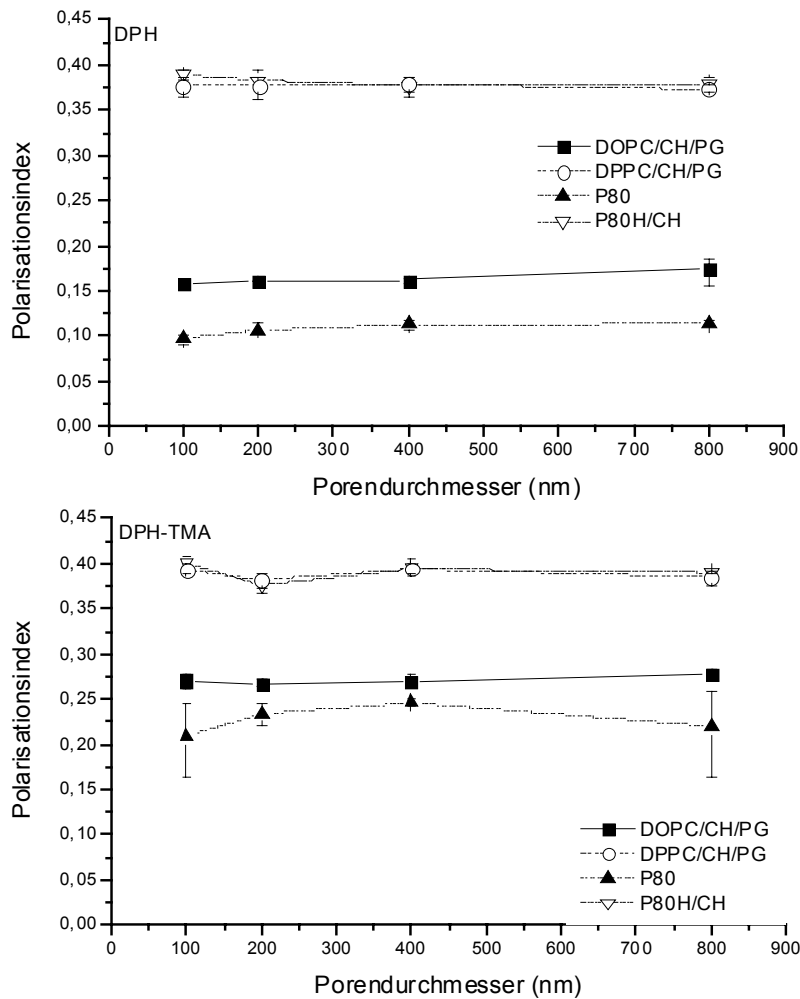


Abb. 22 Abhängigkeit des Polarisationsindex von DPH bzw. DPH-TMA in Liposomen mit verschiedenen Lipidgrundlagen von der Porengröße des zur Extrusion eingesetzten Membranfilters ($\bar{x} \pm R$, $n = 3$)

Herstellung von Liposomen mit steigendem Anteil der Lipidgrundlage

Für einen möglichen okklusiven Effekt von Liposomen auf der Hautoberfläche, die penetrationsfördernden Eigenschaften und die Wirkstoffreservoirbildung ist evtl. die Konzentration an Phospholipiden von Bedeutung. Neben Autoren, die keine Angaben zu der Konzentration von Lipiden in den untersuchten Zubereitungen machen [242, 243], finden sich je nach Experimentator Liposomenformulierungen mit sehr niedrigen (0,1 – 0,2 % [244]), mittleren 3 % [245]; 5 % [246, 247]) und sehr hohen (10 % [223]) Lipidkonzentrationen. Die Verschiedenartigkeit der eingesetzten Lipidkonzentrationen schränkt die Vergleichbarkeit der Ergebnisse

von Studien zusammen mit der stark unterschiedlichen Auswahl der Liposomenzusammensetzung weiter ein.

Nachfolgend sollten die Auswirkungen der Konzentration der Lipidgrundlage auf die Extrusionsfähigkeit von Liposomen sowie die Größe und den Polydispersitätsindex der extrudierten Vesikel untersucht werden. Dazu wurden Liposomenformulierungen aus den Grundlagen DOPC/CH/PG (6,5:0,5:3,0); DPPC/CH/PG (4,0:5,0:1,0); P80, P80H/CH (6,0:4,0) bzw. Presomen® C1 mit steigendem Lipidanteil (5, 10, 15 und 20 %) nach der unter 7.6 beschriebenen Methode hergestellt. Die Extrusion erfolgte über 25 Zyklen mit zwei Membranfiltern der Porengröße von 200 nm.

Mit steigender Konzentration der Grundlage wurden die Vesikelgrößen von Liposomen aus DOPC/CH/PG, DPPC/CH/PG und P80 nur geringfügig verändert (Abb. 23). Dagegen nahm der Durchmesser von Liposomen aus den Grundlagen P80H/CH und Presomen® C1 mit steigenden Lipidkonzentrationen zu. Dies ist auf die mit steigender Konzentration der Lipidgrundlage abnehmende Extrusionsgeschwindigkeit und die dadurch wahrscheinlich verminderte Zerteilung der multilamellaren Liposomen zurückzuführen.

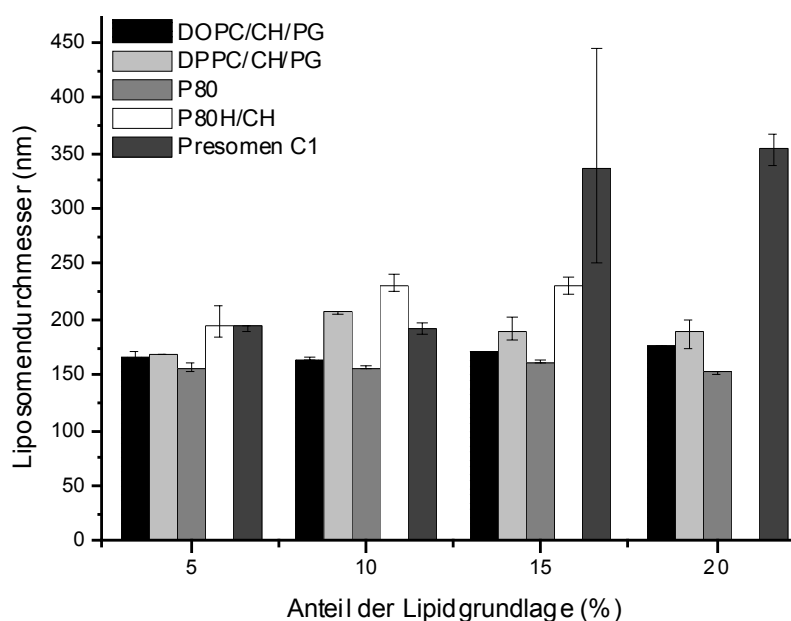


Abb. 23 Abhängigkeit des Durchmessers von Liposomen mit verschiedenen Lipidgrundlagen von der Konzentration der Lipidgrundlage ($\bar{x} \pm R$, $n = 3$)

Bei P80H und Presomen® C1 handelt es sich um hydrierte Soja- bzw. Ei-Lecithine, die sehr hohe Phasenübergangstemperaturen ($> 80\text{ }^{\circ}\text{C}$) aufweisen. Aufgrund der unzureichenden Möglichkeiten zur Temperierung des LiposoFast-Membranextruders, können diese Lipide nur unterhalb ihrer Phasenübergangstemperatur extrudiert werden. In der Folge steigt der, mit zunehmenden Lipidgehalt in der Formulierung, notwendige Extrusionsdruck stark an, wodurch es zum Zerreißen der Membranfilter kommen kann. Aus diesem Grund sind Zubereitungen mit Liposomen aus der Grundlage P80H/CH mit einem Lipidgehalt von 20 % nicht und Zubereitungen aus Presomen® C1 nur sehr schlecht extrudierbar.

Nach der Membranextrusion weisen die Liposomen mit den verschiedenen Lipidgrundlagen einen Polydispersitätsindex auf, der für Zubereitungen mit einer engen Vesikelgrößenverteilungsbreite charakteristisch ist (Abb 24). Durch die Erhöhung des Lipidanteils in der Formulierung steigen die Polydispersitätsindizes mit Ausnahme der Formulierungen aus DPPC/CH/PG an. Ab einem Lipidgehalt von 15 % liegen Liposomen der Grundlagen P80H/CH und Presomen® C1 mit einer breiten Vesikelgrößenverteilungsbreite in der Formulierung vor.

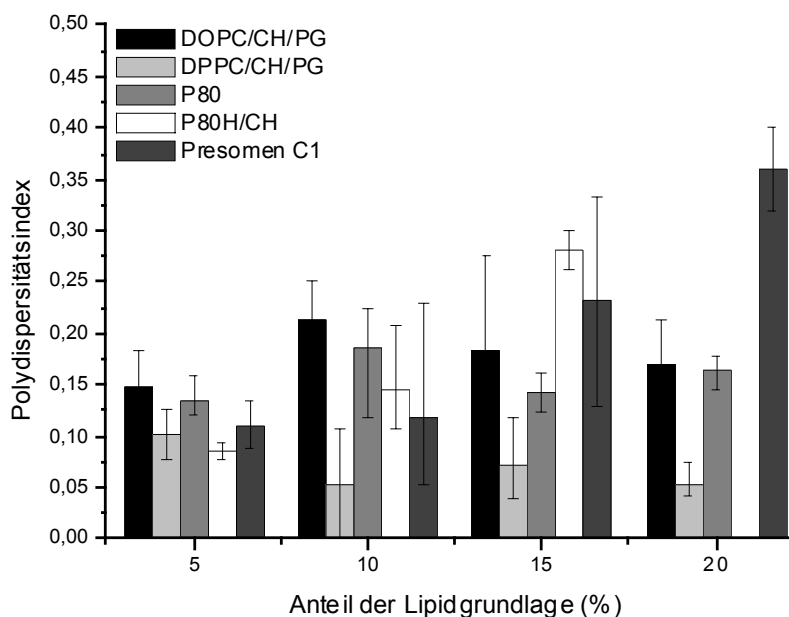


Abb. 24 Abhängigkeit des Polydispersitätsindex von Liposomen mit verschiedenen Lipidgrundlagen von der Konzentration der Lipidgrundlage ($\bar{x} \pm R$, $n = 3$)

Bei Liposomen der Grundlage DPPC/CH/PG nimmt der Polydispersitätsindex mit steigender Konzentration in der Lipidgrundlage ab. Ab einem Lipidanteil von 20 % liegen die Vesikel

unimodal verteilt vor.

Die Ergebnisse dieser Untersuchung belegen, dass Liposomen-Präparationen aus den Grundlagen DOPC/CH/PG, DPPC/CH/PG und P80 mit hohen Lecithinkonzentrationen hergestellt werden können, ohne dass die Vesikelgröße und die Größenverteilungsbreite stark verändert werden. Der Lipidgehalt von Zubereitungen aus den Lipidgrundlagen P80H/CH und Presomen[®] C1 sollte jedoch auf maximal 10 % begrenzt werden, um die Entstehung einer breiten Vesikelgrößenverteilungsbreite bzw. das Zerreißen der zur Extrusion verwendeten Polycarbonatmembranen zu verhindern.

3.1.3 Beladung von Liposomen mit Nitroxylradikalen

Mit Hilfe der ESR-Spektroskopie und –Tomografie lassen sich bei Verwendung geeigneter Nitroxylradikale als Spinsonden Informationen über die Sondenumgebung (z.B. Mikropolarität, Mikroviskosität und pH-Wert, s. auch 6.2.1.) gewinnen. Daraus ergeben sich u.a. Möglichkeiten der nichtinvasiven Untersuchung struktureller und dynamischer Eigenschaften von Arzneiträgersystemen *in vitro* und *in vivo*. Unter diesem Gesichtspunkt sollten für die weiteren Untersuchungen Liposomen mit entsprechenden Spinsonden beladen und die Liposomeneigenschaften untersucht werden.

3.1.3.1 Eingesetzte Nitroxylradikale

Nachfolgend sollten die für die Untersuchungen ausgewählten Nitroxylradikale mit Piperidin- bzw. Oxazolidininstruktur kurz charakterisiert und ihre Auswahlkriterien dargestellt werden. Diese N,N-disubstituierten Verbindungen verfügen über ein ungepaartes Elektron und sind somit paramagnetisch. Einige ausgewählte Eigenschaften sind in Tab. 3 dargestellt. Aus den Strukturen der verwendeten Spinsonden ergeben sich entsprechende Unterschiede in Bezug auf ihre Lipophilie, die für die Beladung von Liposomen von besonderer Bedeutung ist (Abb. 25). Als Maß für die Lipophilie der verwendeten Nitroxylradikale kann der n-Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizient herangezogen werden.

Tabelle 3 Liste der verwendeten Nitroxylradikale sowie ihr n-Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizient P (bei pH 7,4 nach [27])

Nr.	Nitroxid	IUPAC-Bezeichnung	MM	P
1	CAT-1	2,2,6,6-Tetramethyl-4-trimethylammonium-piperidin-1-oxyl-iodid	214,3	≈ 0
2	TEMPO	2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-1-oxyl	156,2	63
3	^{15}N -TEMPO	^{15}N -2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-1-oxyl	156,2	--
4	TEMPOL	4-Hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl	172,2	3,7
5	TEMPOL-benzoat	4-Hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl-benzoat	276,31	$>> 100$ >300 [3]
6	5-Doxyl-palmitinsäure	5-2 (4,4-dimethyl-1,3-oxazolidin-3-oxyl) hexadecansäure	372,56	--

Den kleinsten Verteilungskoeffizienten der verwendeten Spinsonden weist CAT-1 auf. Für diese ist aufgrund ihrer positiven Ladung eine geringe Membrangängigkeit und daher dauerhafte Verkapselung im wässrigen Innenraum von Liposomen erwarten. Für Untersuchungen der Fragestellung, ob eine Penetration intakter Vesikel in die Haut stattfindet ist dieser Punkt von besonderer Bedeutung. Spinsonden, die im Inneren von intakten Liposomen verkapselt vorliegen, sind vor einer Reduktion durch Reduktionsmittel (z.B. Ascorbinsäure) bzw. Enzyme (z.B. Thioredoxinreduktase) in der Haut geschützt. Dagegen werden Spinsonden, die aus zerfallenen Liposomen freigesetzt wurden, durch diese zu diamagnetischen, also ESR-stummen Verbindungen reduziert. Aus dem Reduktionsverhalten der Spinsonden kann daher auf den Zustand der Vesikel in der Haut geschlossen werden. Der Rückschluss auf die Integrität der Liposomen ist jedoch nur dann erlaubt, wenn die Freisetzung der Spinsonde aus intakten Liposomen weitgehend ausgeschlossen und von einer schnellen Reduktion der Sonden nach dem Zerfall der Vesikel ausgegangen werden kann.

TEMPO bzw. TEMPOL sind amphiphile Sonden, die aufgrund ihrer Verteilungskoeffizienten eine unterschiedlich stark ausgeprägte Affinität zu den Lipiddoppelmembranen von Liposomen aufweisen. Durch die Auswertung ihrer polaritätsabhängigen Hyperfeinaufspaltungen werden von diesen Sonden in besonderem Maße Aussagen zur Beeinflussung der Mikropolarität ihrer Umgebung nach epikutaner Applikation von topischen Formulierungen erwartet.

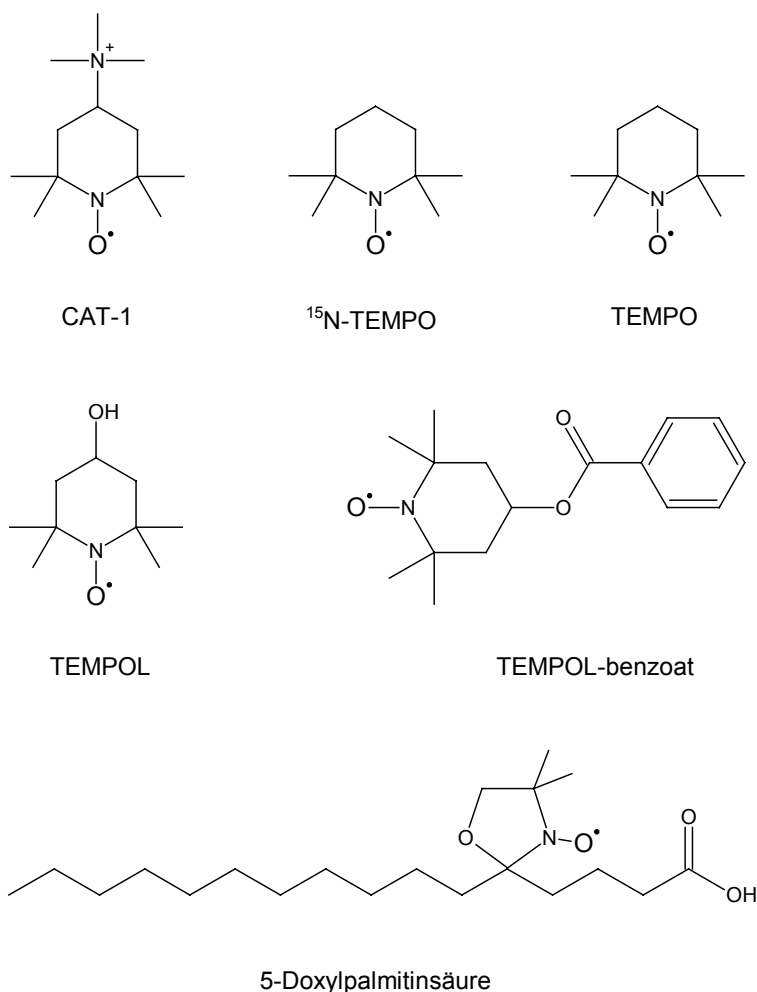


Abb. 25 Strukturformeln der verwendeten Spinsonden

Neben Penetrationsuntersuchungen mit hydrophilen [248] und amphiphilen Wirkstoffen [249] wurde die Penetration lipophiler Substanzen aus liposomalen Formulierungen in die Haut untersucht [250, 251]. Besonderes Interesse gilt den Steroiden (z.B. Hydrocortison, Betamethason dipropionat) [252]. Daher schien es naheliegend, für Penetrationsversuche strukturverwandte Spinsonden wie z.B. das 5- α -Doxylcholestan heranzuziehen. Vorversuche mit dieser Spinsonde zeigten jedoch, dass aufgrund des hohen Immobilisierungsgrades der Sonde in Liposomenmembranen und der damit einhergehenden Verbreiterung der Linien des ESR-Signals nur mit geringen Signalamplituden gerechnet werden kann. Für die ESR-Tomografie, bei der nur jeweils ein Teil der zur Verfügung stehenden Spinsonden zur Resonanz gebracht wird, sind vergleichsweise hohe Signalamplituden zur Verminderung des Signal-Rausch-Verhältnis von Vorteil. Daher wurde die Spinsonde TEMPOL-benzoat, bei der eine

vergleichsweise geringere Immobilisierung auftrat, als lipophile Modellsubstanz ausgewählt. Für Untersuchungen an Liposomenmembranen und den Lipiden des Stratum corneum wurde die Spinsonde 5-Doxylpalmitinsäure ausgewählt. Im Gegensatz zu Stearinsäure, deren Derivat 5-Doxylstearinsäure von anderen Autoren als Spinsonde verwendet wurde, ist Palmitinsäure in hohen Konzentrationen in den Phospholipiden der natürlichen Soja- und Eilecithine bzw. den Phospholipiden der Haut enthalten [226].

3.1.3.2 Verteilung von CAT-1, TEMPO, TEMPOL und TEMPOL-benzoat in Liposomenformulierungen

Im folgenden Versuch sollte die Möglichkeit zur Beladung von Liposomen aus den Grundlagen DOPC/CH/PG; DPPC/CH/PG; P80, P80H/CH bzw. Presomen[®] C1 mit den Spinsonden CAT-1, TEMPO, TEMPOL bzw. TEMPOL-benzoat überprüft werden (vgl. 5.3.5.). Dazu wurden die Lipidgrundlagen mit Spinsonden-Lösungen der Konzentration 2,5; 10; 20 bzw. 30 mM in Phosphatpuffer hydratisiert und nach der unter 5.3.5 beschriebenen Methode hergestellt. Aufgrund der sehr geringen Löslichkeit von TEMPOL-benzoat wurde die Spinsonde zunächst in die Lipide inkorporiert und die Mischung anschließend mit Phosphatpuffer hydratisiert. Die Konzentration der Spinsonde in den Formulierungen betrug 2,5; 5,0; 10,0 bzw. 20 mM. Alle untersuchten Liposomenformulierungen hatten einen Lipidgehalt von 100 mg/ml.

Erwartungsgemäß konnten aus allen Lipidgrundlagen Liposomenformulierungen hergestellt werden, die mit den Spinsonden CAT-1, TEMPO bzw. TEMPOL in einer Konzentration von 2,5 mM bis 30 mM beladen waren. Im Gegensatz dazu konnte die lipophile Spinsonde TEMPOL-benzoat nur in den Lipidgrundlagen DOPC/CH/PG bzw. P80 im gesamten Konzentrationsbereich verkapselt werden. Bei der Herstellung von Liposomen aus den Grundlagen DPPC/CH/PG bzw. P80H/CH kristallisierte die Spinsonde während der Durchführung der Frier-Tau-Zyklen aus und konnte auch durch eine anschließende Erwärmung der gesamten Probe über die Phasenübergangstemperatur der Lipidgrundlagen nicht mehr in Lösung gebracht werden. Die geringe Beladungskapazität von DPPC/CH/PG- bzw. P80H/CH-Liposomen geht auf den höheren Ordnungszustand der Lipidmembranen aufgrund

der fehlenden Doppelbindungen in den Alkylketten der Fettsäurereste der Phospholipide und Begleitstoffe zurück (vgl. 3.1.2.1). Oberhalb der Phasenübergangstemperatur ist der Ordnungsgrad der Lipide vermindert, wodurch die initiale Löslichkeit von hohen Konzentrationen der Spinsonde in den Lipiddoppelmembranen erklärt werden kann. Durch die Abkühlung der Zubereitung in flüssigem Stickstoff kommt es jedoch zu einem Übergang der Lipidmembran von der Flüssig-Phase zur Gel-Phase und damit zu einer Zunahme des Ordnungsgrades der Lipide und zu einer Abnahme der Membranflexibilität, wodurch die Spinsonde aus der Membran gedrängt wird und aufgrund ihrer geringen Löslichkeit im Phosphatpuffer kristallisiert. Das ESR-Spektrum dieser Zubereitungen besteht, im Gegensatz zu Formulierungen aus DOPC/CH/PG bzw. P80, nicht aus einem einfachen Drei-Linien-Spektrum (Abb. 26, links), sondern aus einer Überlagerung eines breiten Singulett und eines Triplett (Abb. 26, rechts). Während das Singulett auf die kristalline bzw. aggregierte Spinsonde zurückzuführen ist, kann das Triplett dem mobilen Anteil der Spinsonde zugeordnet werden, der sich anteilig in der Liposomenmembran bzw. dem im Dispersionsmedium befindet.

Die Verteilung der eingearbeiteten Spinsonden zwischen der Lipidmembran von Liposomen und dem Dispersionsmedium sollte nachfolgend untersucht werden.

Die ESR-Spektroskopie bietet die Möglichkeit, mit Hilfe von Spinsonden, die eine polaritätsabhängige Hyperfeinkopplungskonstante (a_N) besitzen, Verteilungen zwischen hydrophilen und lipophilen Phasen direkt und ohne weitere Aufbereitungen der Probe bestimmen zu können. Die Beeinflussung der Hyperfeinkopplungskonstante erfolgt durch die Veränderung der Spindichte am Stickstoff der NO-Gruppe (vgl. [27]). In polarer Umgebung ist die Spindichte des ungepaarten Elektrons am Stickstoff ebenso wie die zugehörige Hyperfeinkopplungskonstante größer als in apolarer Umgebung. Im Vergleich zu dieser ist daher das Spektrum weiter aufgespalten. In Zubereitungen, in denen beide Zustände nebeneinander vorliegen, kommt es zu einer Überlagerung der Einzelspektren der lipophilen bzw. hydrophilen Komponente zu einem Gesamtspektrum, das in Abb. 27 exemplarisch für die Spinsonde TEMPO in Liposomen aus der Grundlage P80 dargestellt ist. Mit Hilfe von Auswertungsprogrammen [253] können die Anteile der Einzelspektren am Gesamtspektrum und damit die Anteile der Spinsonde in der Lipidmembran und im Dispersionsmedium bestimmt werden. Diese Möglichkeit ist besonders für amphiphile Proben von Interesse, deren Phasen-

verteilung mit anderen Techniken nur schwer ermittelt werden kann.

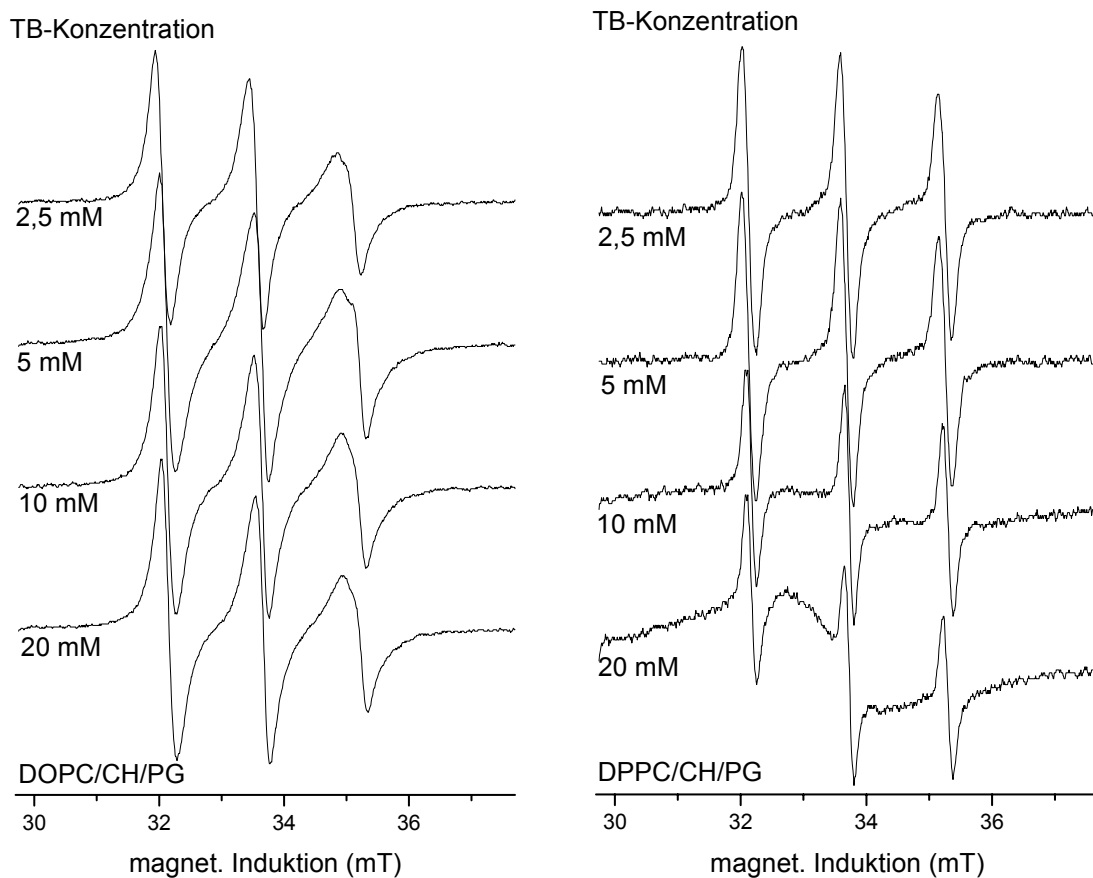


Abb. 26 X-Band ESR-Spektren von TEMPOL-benzoat (TB) in Liposomen aus den Lipidgrundlagen DOPC/CH/PG bzw. DPPC/CH/PG in Abhängigkeit von der Konzentration der Spinsonde (2,5; 5,0; 10 und 20 mM)

Die beladenen Liposomenformulierungen wurden mit der X-Band-ESR (9,5 GHz) vermessen und die erhaltenen Spektren mit dem Auswertungsprogramm PEST [253] analysiert. Die Auswertung der Verteilung der inkorporierten Spinsonden erfolgte lediglich für die Formulierungen mit einer Spinsondenkonzentration von 2,5 mM. Bei höheren Sondenkonzentrationen nimmt die Linienbreite der ESR-Spektren stark zu, wodurch die Differenzierbarkeit zwischen dem lipophilen bzw. hydrophilen Anteil des Gesamtspektrums stark abnimmt (Abb 27).

Die Ergebnisse der Auswertung sind in Tab. 4 dargestellt. Aufgrund der positiven Ladung der Spinsonde CAT-1 und ihres Verteilungskoeffizienten befinden sich $\approx 100\%$ der Spinsondenmoleküle in allen Zubereitungen im wässrigen Dispersionsmedium. Es kann jedoch davon ausgegangen werden, dass die Aufenthaltswahrscheinlichkeit an der Oberfläche der Liposomen aufgrund von ionischen Wechselwirkungen zwischen negativen Ladungsträgern der

Membran und CAT-1 erhöht ist. Anhand von veränderten Mikroviskositäten der CAT-1-Umgebung konnte dies bereits für Formulierungen mit negativ geladenen Mizellen gezeigt werden. Trotz der entgegengesetzten Ladungen kommt es jedoch nicht zu einer gerichteten Adsorption an die Oberfläche dieser Mizellen [254].

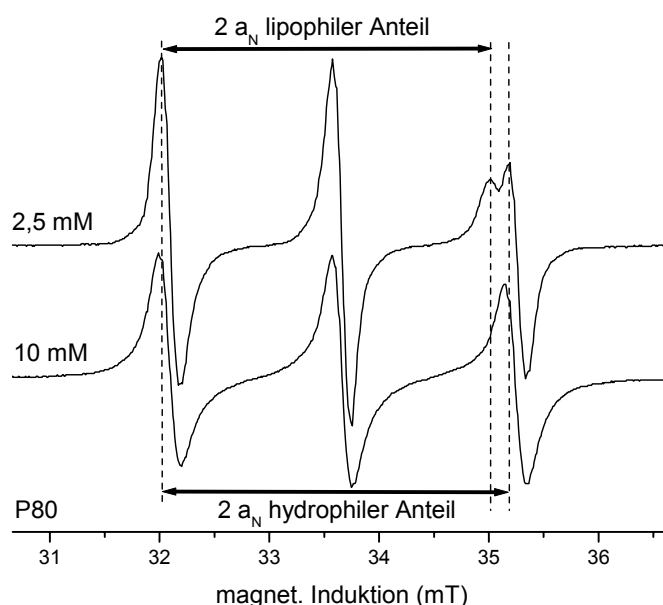


Abb. 27 ESR-Spektrum der Spinsonde TEMPO (2,5 mM bzw. 10 mM) in Liposomen aus der Lipidgrundlage P80

Der Austausch der quartären Ammoniumgruppe in Position 4 des Piperidinringes von CAT-1 gegen eine Hydroxylfunktion führt zu einem Anstieg des Verteilungskoeffizienten von ≈ 0 auf 3,7. In der Folge konnten geringe Anteile (1,1 % bzw. 2,7 %) der ungeladenen Spinsonde TEMPOL in der Membran von Liposomen aus DOPC/CH/PG bzw. P80, nicht aber in Liposomen mit rigiden Membranen (vgl. 3.1.2.2) nachgewiesen werden. Steigt der Verteilungskoeffizient durch den Wegfall des Substituenten in Position 4 weiter an, können geringe Mengen der Sonde (1,9; 2,6 bzw. 3,5 %) in den rigiden Membranen von DPPC/CH/PG, P80H/CH bzw. Presomen[®] C1 nachgewiesen werden. Diese sind jedoch erheblich geringer als die Anteile von TEMPOL in Liposomen der Grundlagen DOPC/CH/PG und P80, deren Membranen sich in der Flüssig-Phase befinden.

Aufgrund des hohen Verteilungskoeffizienten ($\gg 100$ bzw. > 300) der Spinsonde TEMPOL-benzoat wurde erwartet, dass bei einer Konzentrationen von 2,5 mM und einem Verhältnis von etwa 1:35 bis 1:50 (TB/Lipide) nahezu 100 % der Spinsonde in der Liposomenmembran

verkapselt vorliegen. Diese Annahme trifft für Formulierungen mit den Grundlagen DOPC/CH/PG bzw. P80 zu. Die Spektrenauswertung ergab, dass rund 90 % der Spinsonde in den Lipidmembranen dieser Liposomen vorlagen. In Liposomen mit den Grundlagen DPPC/CH/PG, P80H/CH bzw. Presomen® C1 wurde dagegen nur ein Anteil von 51 bis 60 % in der Lipidmembran gelöst. Da sich die Membranen dieser Grundlagen bei Raumtemperatur in der Gel-Phase befinden, kann davon ausgegangen werden, dass die verminderte Löslichkeit auf die Struktur der Membranlipide zurückzuführen ist. Dieses bekannte Phänomen kann zur Bestimmung der Phasenübergangstemperatur von Lipiden mit Hilfe von Spinsonden herangezogen werden [255]. Der Verteilungskoeffizient der Sonde steigt bei der Phasenübergangstemperatur und dem damit verbundenen Übergang der Membranen von der Gel-Phase in die Flüssig-Phase stark an. Aus der Bestimmung des Verteilungskoeffizienten als Funktion der Temperatur kann dann die Lipidphasen-Umwandlungstemperatur bestimmt werden.

Tabelle. 4 Anteile und Hyperfeinkopplungskonstanten a_N der lipophilen und hydrophilen Komponenten des Gesamtspektrums von Spinsonden in Liposomenformulierungen 24 Stunden nach der Herstellung

Spinsonde	Lipidgrundlage	a_N lipophil (mT)	lipophiler Anteil (%)	a_N hydrophil (mT)	hydrophiler Anteil (%)
CAT-1	DOPC/CH/PG	--	0	1,546	100
	DPPC/CH/PG	--	0	1,546	100
	P80	--	0	1,546	100
	P80H	--	0	1,546	100
	Presomen® C1	--	0	1,546	100
TEMPO	DOPC/CH/PG	1,460	$28,6 \pm 4,6$	1,590	$71,4 \pm 4,6$
	DPPC/CH/PG	1,450	$1,9 \pm 3,2$	1,590	$98,1 \pm 3,2$
	P80	1,460	$34,8 \pm 5,0$	1,590	$65,2 \pm 5,0$
	P80H	1,450	$2,6 \pm 3,8$	1,590	$97,4 \pm 3,8$
	Presomen® C1	1,400	$3,5 \pm 4,5$	1,594	$96,5 \pm 4,5$
TEMPOL	DOPC/CH/PG	1,450	$1,1 \pm 1,6$	1,570	$98,7 \pm 1,6$
	DPPC/CH/PG	1,450	0	1,570	$100 \pm 0,0$
	P80	1,450	$2,7 \pm 2,4$	1,570	$97,3 \pm 2,4$
	P80H	1,450	0	1,570	$100 \pm 0,0$
	Presomen® C1	1,450	0	1,570	$100 \pm 0,0$
TEMPOL-benzoat	DOPC/CH/PG	1,454	$88,2 \pm 4,7$	1,568	$11,8 \pm 4,7$
	DPPC/CH/PG	1,470	$55,7 \pm 4,9$	1,566	$44,3 \pm 4,9$
	P80	1,470	$88,9 \pm 3,0$	1,570	$11,1 \pm 3,0$
	P80H	1,470	$51,4 \pm 3,4$	1,566	$48,6 \pm 3,4$
	Presomen® C1	1,470	$60,3 \pm 0,9$	1,566	$39,7 \pm 0,9$

Die Formulierungen wurden im Kühlschrank 90 Tage gelagert und anschließend erneut vermessen. Die Auswertung der ESR-Spektren zeigte, dass sich die Verteilung der Sonde während der Lagerung nicht verändert hat (Tab. 5).

Tabelle. 5 Anteile und Hyperfeinkopplungskonstanten a_N der lipophilen und hydrophilen Komponenten des Gesamtspektrums von Spinsonden in Liposomenformulierungen nach 90 Tagen

Spinsonde	Lipidgrundlage	a_N lipophil (mT)	lipophiler Anteil (%)	a_N hydrophil (mT)	hydrophiler Anteil (%)
CAT-1	DOPC/CH/PG	--	0	1,550	100
	DPPC/CH/PG	--	0	1,550	100
	P80	--	0	1,550	100
	P80H	--	0	1,550	100
	Presomen® C1	--	0	1,550	100
TEMPO	DOPC/CH/PG	1,464	36,0	1,590	64,0
	DPPC/CH/PG	1,450	0	1,590	100
	P80	1,460	34,3	1,590	65,7
	P80H	1,450	0	1,594	100
	Presomen® C1	1,400	0,0	1,594	100
TEMPOL	DOPC/CH/PG	1,450	1,7	1,570	98,3
	DPPC/CH/PG	1,450	0	1,570	100
	P80	1,450	95,7	1,570	4,3
	P80H	1,450	0	1,570	100
	Presomen® C1	1,450	0	1,570	100
TEMPOL- benzoat	DOPC/CH/PG	1,454	82,4	1,568	17,6
	DPPC/CH/PG	1,470	50,3	1,566	49,7
	P80	1,470	94,1	1,570	5,9
	P80H	1,470	38,3	1,566	61,7
	Presomen® C1	1,470	56,5	1,566	43,5

Als Ergebnis dieser Untersuchung kann festgehalten werden, dass Spinsonden in Abhängigkeit von ihrem Verteilungskoeffizienten und der Auswahl der Lipidgrundlagen mit der Membran von Liposomen wechselwirken. Diese Wechselwirkungen sollten bei der Auswertung der durchzuführenden Transportstudien mit der ESR-Tomografie (vgl. 3.5) und der Diskussion möglicher penetrationsfördernden Eigenschaften von Liposomen bzw. dem ggf. auftretenden Co-Transport der Sonden mit den Membranlipiden in die Haut beachtet werden.

3.1.3.3 Kurzzeitstabilität beladener Liposomen

Zur Überprüfung des Zeitraums, über den die liposomalen Zubereitungen für die vorgesehenen Untersuchungen ohne gravierende Veränderungen ihrer Eigenschaften verwendbar sind, wurde deren Kurzzeitstabilität getestet. Dies erfolgte an Systemen mit den Grundlagen DOPC/CH/PG (6,5:0,5:3,0); DPPC/CH/PG (4,0:5,0:1,0); P80, P80H/CH (6,0:4,0) bzw. Presomen[®] C1 und den inkorporierten Spinsonden CAT-1, TEMPO, TEMPOL bzw. TEMPOL-benzoat über einen Zeitraum von 90 Tagen. Die Spinsonden lagen in den Formulierungen in folgenden Konzentrationen vor: CAT-1, TEMPO bzw. TEMPOL jeweils 30 mM, TEMPOL-benzoat in DOPC/CH/PG- bzw. P80-Liposomen je 10 mM und in DPPC/CH/PG-, P80H/CH- bzw. Presomen[®] C1-Liposomen aufgrund der geringeren Verkapselungseffizienz je 2,5 mM. Als Stabilitätsparameter der physikalischen Stabilität wurden die Liposomengröße, der Polydispersitätsindex und das Zetapotenzial herangezogen. Unbeladene Liposomen der jeweiligen Grundlagen dienten als Referenz. Darüber hinaus wurde die Signalintensität des Mittelpeaks der ESR-Spektren als Maß für die Stabilität der Spinsonden in den jeweiligen Zubereitungen herangezogen. Es wurden Liposomendispersionen mit einem Lipidgehalt von 5 % in isotonischem Phosphatpuffer untersucht, die mit einem Membranfilter der Porengröße 200 nm über 25 Zyklen extrudiert wurden. Die Lagerung der Proben erfolgte im Kühlschrank bei 4 °C.

Partikelgrößen, Polydispersitätsindex und Zetapotenziale

Durch die Beladung von Liposomen mit Spinsonden wurden die untersuchten Parameter der Vesikel unterschiedlich stark beeinflusst.

Die Liposomengrößen der Systeme unterlagen in Abhängigkeit von der Lipidgrundlage und der inkorporierten Spinsonde z.T. erheblichen Veränderungen (Abb. 28 – 32). Während die Vesikelgrößen von Liposomen mit der Grundlage P80 nur über einen Größenbereich von ca. 25 nm variierten, waren die Veränderungen des Liposomendurchmessers in den übrigen Liposomenzubereitungen stärker ausgeprägt, und zwar in der Reihenfolge P80H > Presomen[®] C1 > DOPC > DPPC.

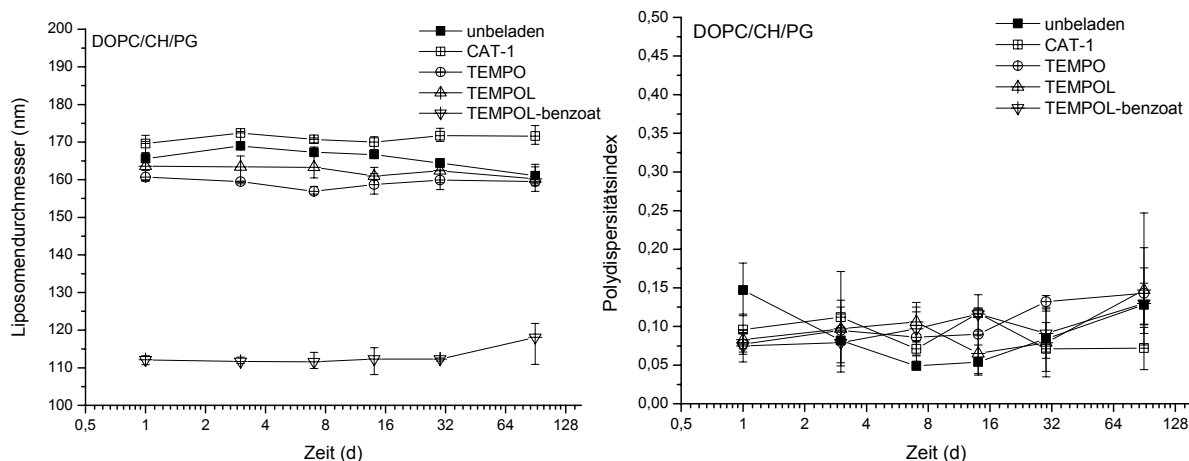


Abb. 28 Abhängigkeit der Größe und des Polydispersitätsindex von der Lagerdauer und der Beladung von DOPC/CH/PG-Liposomen mit verschiedenen Spinsonden ($\bar{x} \pm R$, n = 3)

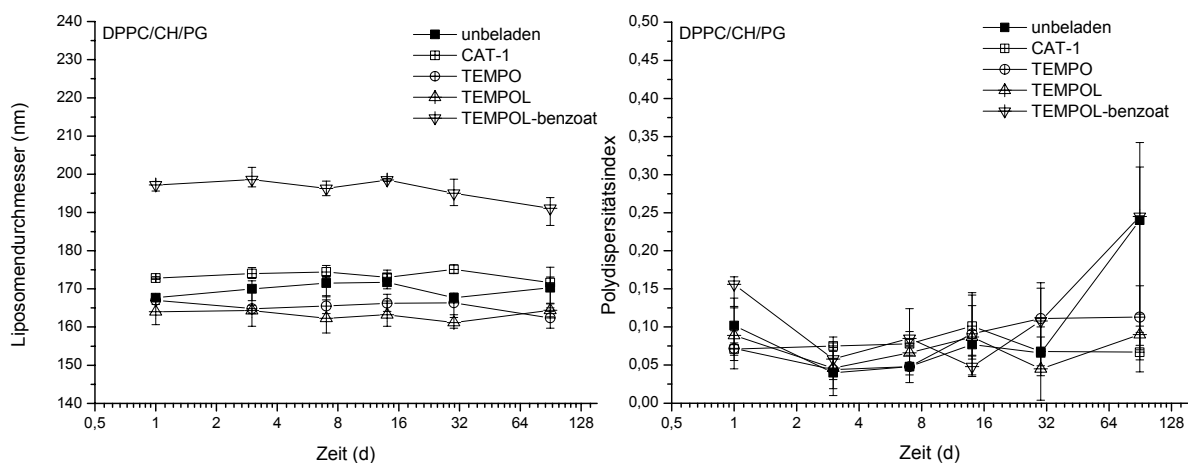


Abb. 29 Abhängigkeit der Größe und des Polydispersitätsindex von der Lagerdauer und der Beladung von DPPC/CH/PG-Liposomen mit verschiedenen Spinsonden ($\bar{x} \pm R$, n = 3)

Eine einheitliche Veränderung der Liposomendurchmesser durch die Inkorporation einer bestimmten Spinsonde konnte nicht festgestellt werden. Die positiv geladene Spinsonde CAT-1 führt z.B. bei Liposomen mit fluiden Lipidmembranen im Vergleich zu unbeladenen Liposomen zu einer Vergrößerung des Vesikeldurchmessers. In Liposomen mit rigiden Membranen dagegen hängt die Verschiebung des Vesikeldurchmessers von der Lipidgrundlage ab. Während der Durchmesser von Liposomen aus DPPC/CH/PG und Presomen® C1 vergrößert wird, nimmt der von P80H/CH ab.

Im Vergleich zu CAT-1 werden die Vesikeldurchmesser durch die Spinsonde TEMPOL-

benzoat relativ einheitlich verschoben. Bei der Herstellung von TB-beladenen Liposomen aus Grundlagen, die keine Doppelbindungen in den Alkylketten der Fettsäurereste aufweisen, werden die Vesikeldurchmesser erhöht. Dagegen werden die Durchmesser von Liposomen mit fluiden Membranen im Vergleich zu unbeladenen Liposomen vermindert. Diese Verminderung ist in Liposomen der Grundlage DOPC/CH/PG besonders stark ausgeprägt, ihr Durchmesser nimmt durch den TB-Zusatz um ca. 60 nm ab.

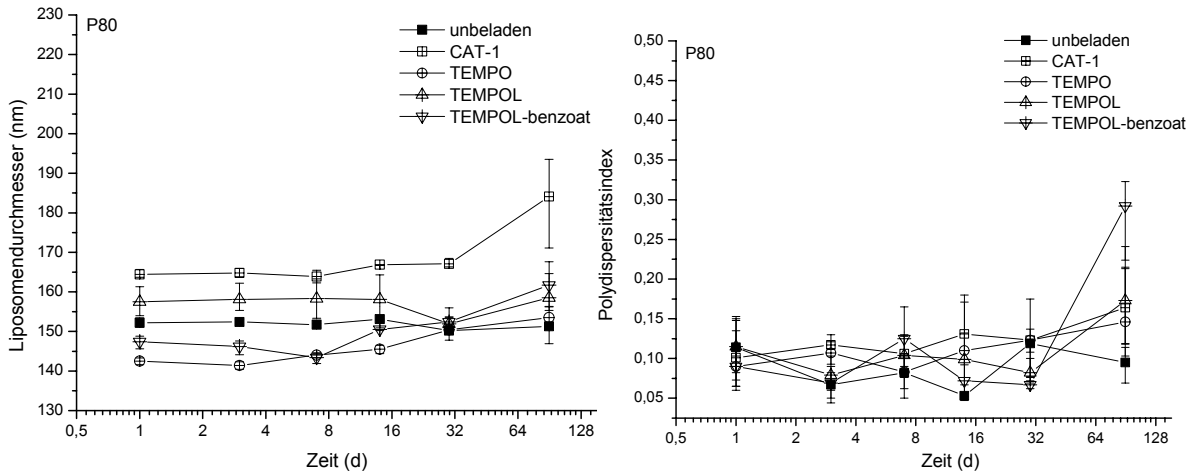


Abb. 30 Abhängigkeit der Größe und des Polydispersitätsindex von der Lagerdauer und der Beladung von P80-Liposomen mit verschiedenen Spinsonden ($\bar{x} \pm R$, $n = 3$)

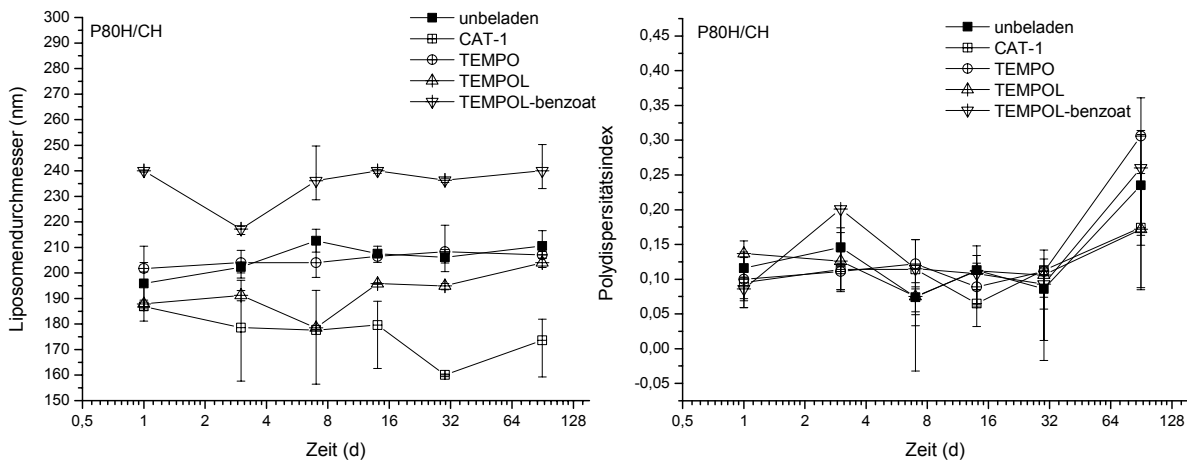


Abb. 31 Abhängigkeit der Größe und des Polydispersitätsindex von der Lagerdauer und der Beladung von P80H/CH-Liposomen mit verschiedenen Spinsonden ($\bar{x} \pm R$, $n = 3$)

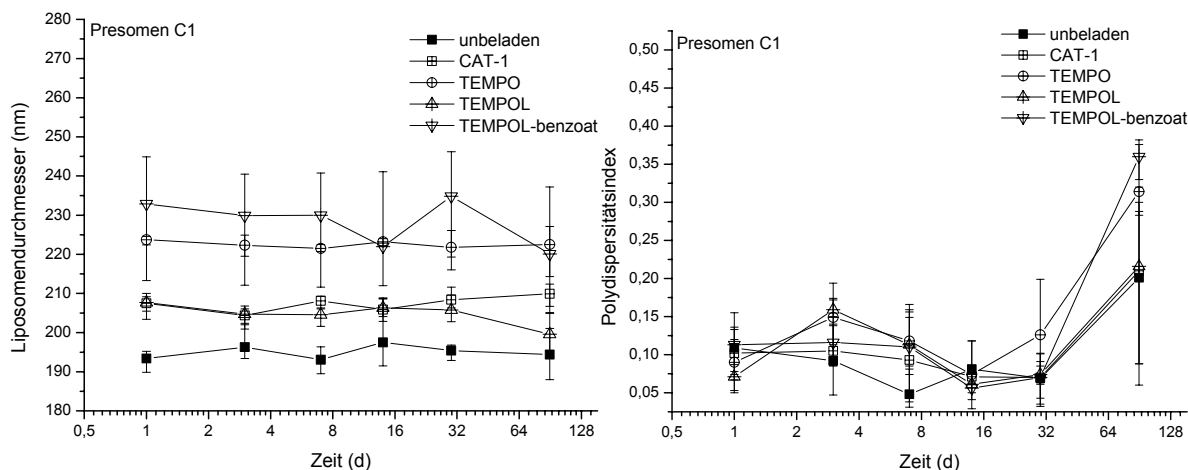


Abb. 32 Abhängigkeit der Größe und des Polydispersitätsindex von der Lagerdauer und der Beladung von Presomen® C1-Liposomen mit verschiedenen Spinsonden ($\bar{x} \pm R$, $n = 3$)

Während der Lagerung über 90 Tage veränderten sich die mittleren Durchmesser der Liposomen aus den unterschiedlichen Grundlagen nur geringfügig, mit einer Ausnahme. Der Durchmesser von P80-Liposomen, die mit der Spinsonde CAT-1 beladen wurden, nahm im Zeitraum zwischen 30 und 90 Tagen um ca. 20 nm zu, was die Umlagerung kleiner Liposomen zu großen Liposomen andeutet.

Die Polydispersitätsindizes der liposomalen Systeme kennzeichneten in den ersten 30 Tagen des Untersuchungszeitraumes Systeme mit engen Vesikelgrößenverteilungen. Ab dem 30. Tag der Lagerung zeigte sich besonders in den Formulierungen mit Liposomen aus DPPC/CH/PG, P80H/CH und Presomen® C1 ein Übergang von eng verteilten zu breit verteilten Vesikelgrößen. Die Polydispersitätsindizes von Liposomen aus DOPC/CH/PG blieben im Gegensatz zu den Polydispersitätsindizes der anderen Formulierungen nahezu konstant im Bereich einer engen Vesikelgrößenverteilungsbreite.

Die Zetapotenziale der Zubereitungen wurden durch den Zusatz von Spinsonden nur unwesentlich verändert (Abb. 33 – 35). Die gemessenen Abweichungen vom Potenzial der unbeladenen Referenz-Liposomen waren in allen Zubereitungen kleiner als ± 10 mV. Die fehlenden Unterschiede der Zetapotenziale unbeladener und beladener Formulierungen sind wahrscheinlich auf die Verdünnung der Probe vor der Vermessung zurückzuführen (vgl. 5.2.3). Durch den Überschuss an Puffer sollte es bei Liposomen, die mit hydrophilen bzw. amphiphilen Proben beladen wurden, zu einer raschen Entfernung der Sonden aus den Lipid-

doppelschichten bzw. der Absorptionsschicht auf der Oberfläche der Vesikel kommen.

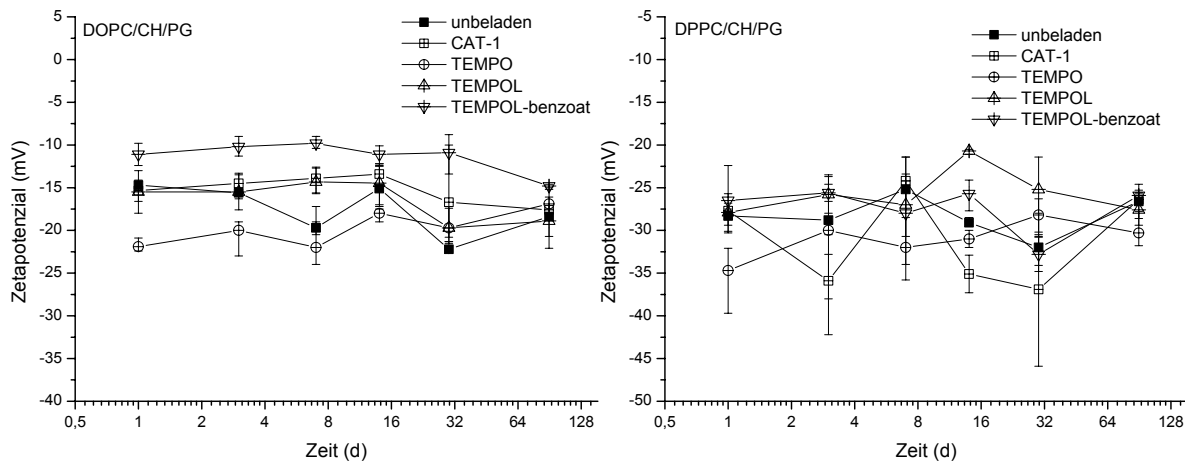


Abb. 33 Abhängigkeit des Zetapotenzials von der Lagerdauer und der Beladung von DOPC/CH/PG- bzw. DPPC/CH/PG-Liposomen mit verschiedenen Spinsonden ($\bar{x} \pm R$, $n = 3$)

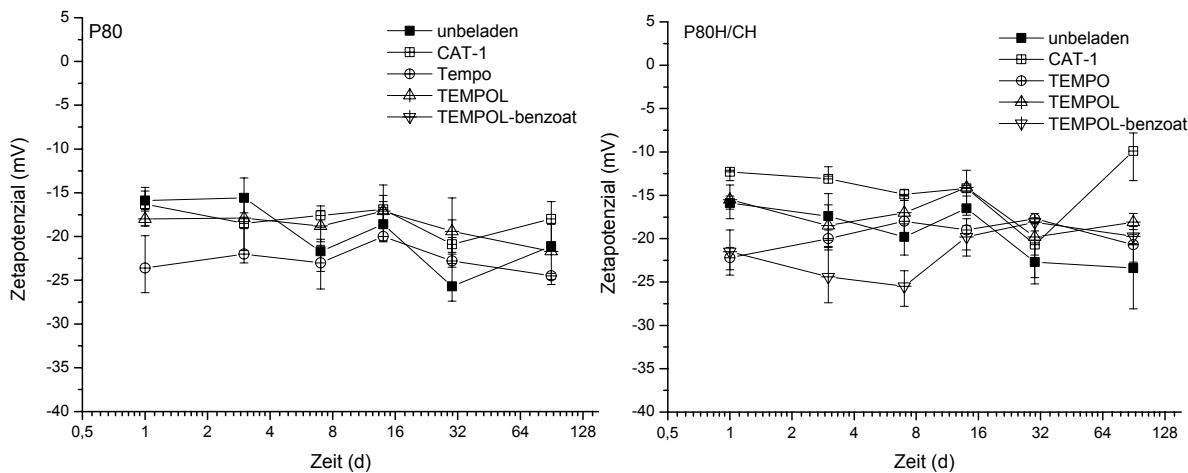


Abb. 34 Abhängigkeit des Zetapotenzials von der Lagerdauer und der Beladung von P80- bzw. P80H/CH-Liposomen mit verschiedenen Spinsonden ($\bar{x} \pm R$, $n = 3$)

Da die Zetapotenziale über den gesamten Untersuchungszeitraum nahezu konstant blieben, kann auch von einer weitgehenden chemischen Stabilität der Membranlipide ausgegangen werden. Deren hydrolytische Spaltung in Lysolecithine und freie Fettsäuren würde im umgekehrten Fall eine Zunahme negativer Ladungsträger in der Lipidmembran und damit eine Absenkung des Nernst- und folglich des Zetapotenzials nach sich ziehen [256].

Nach diesen Ergebnissen kann von einer ausreichenden Lagerstabilität der Liposomen für die

weiteren Untersuchungen ausgegangen werden. Einzelne Formulierungen sollten allerdings in einem Zeitraum von 30 Tagen ihre Verwendung finden.

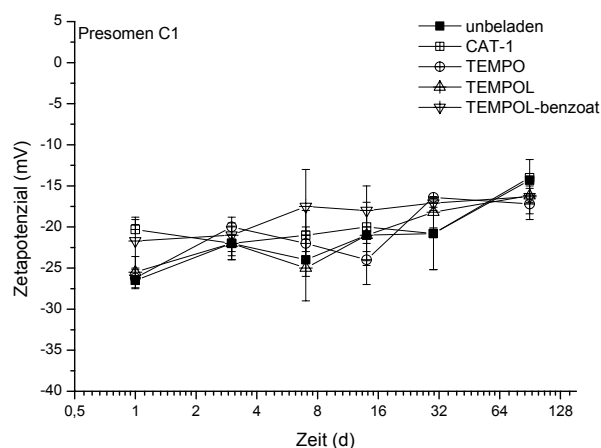


Abb. 35 Abhängigkeit des Zetapotenzials von der Lagerdauer und der Beladung von Presomen® C1-Liposomen mit verschiedenen Spinsonden ($\bar{x} \pm R$, $n = 3$)

Stabilität von CAT-1, TEMPO, TEMPOL und TEMPOL-benzoat

Neben der physikalischen Stabilität der Vesikel ist die Stabilität der inkorporierten Spinsonden für die Verwendungsfähigkeit der hergestellten Liposomenformulierungen von großer Bedeutung. *Im folgenden Versuch sollte daher die Stabilität von CAT-1, TEMPO, TEMPOL und TEMPOL-benzoat in Liposomen anhand der Intensität der zugehörigen ESR-Signale über einen Zeitraum von 90 Tagen untersucht werden.* Dazu wurden die unter 3.1.3.2 untersuchten Formulierungen mit einer Spinsonden-Konzentration von 2,5 mM im Kühlschrank bei 8 °C gelagert und 24 Stunden nach der Herstellung sowie nach 7, 14, 30 bzw. 90 Tagen mit der X-Band-ESR vermessen. Die relative Intensität der Amplitude des Mittelpeaks der ESR-Spektren, die in dem untersuchten Konzentrationsbereich proportional zur Konzentration der Spinsonde ist, wurde zur Bestimmung der Stabilität der Spinsonden in Liposomenzubereitungen herangezogen.

Während der ersten 14 Tage der Lagerung erwiesen sich die Spinsonden in den Liposomenformulierungen als relativ stabil (Abb. 36). Danach nahm die Spinsonden-Konzentration in einigen Zubereitung ab. Dieses wurde auf eine einsetzende, auch makroskopisch erkennbare Verkeimung der Proben in Folge von fehlenden Konservierungsmitteln und der guten Nährstoffgrundlage für Bakterien und Pilze zurückgeführt. Kann die Verkeimung ausgeschlossen

werden, erweisen sich die Nitroxylradikale in Liposomenzubereitungen über lange Zeiträume als stabil. Dies konnte bereits für Nitroxylradikale in Lösungen nachgewiesen werden [27].

Die Verwendungsfähigkeit der Zubereitungen wurde aufgrund der gewonnenen Erkenntnisse auf 14 Tage beschränkt.

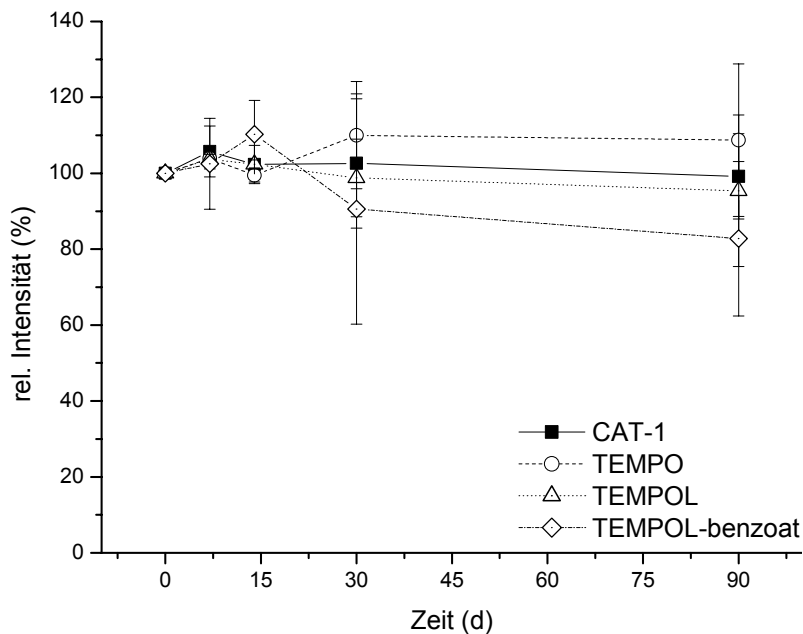


Abb. 36 Abhängigkeit der relativen Signalintensitäten der Spinsonden CAT-1, TEMPO, TEMPOL bzw. TEMPOL-benzoat von der Lagerdauer der Liposomenformulierungen ($n=5$, $\bar{x} \pm s$)

3.1.3.4 Verkapselungseffizienz für CAT-1

Neben der Größe, dem Zetapotenzial und der Membranrigidität ist die Verkapselungseffizienz ein weiterer Parameter zur Charakterisierung von Liposomen, der in dem folgenden Versuch für die Spinsonde CAT-1 bestimmt werden sollte. Dazu wurden die Liposomenformulierungen mit einer Lösung aus Natriumascorbat in Phosphatpuffer versetzt. Durch das Ascorbatanion wird der nicht verkapselte Anteil der Spinsonde zum entsprechenden Hydroxylamin reduziert (vgl. 5.3.6). Das Hydroxylamin ist diamagnetisch und wird mit der ESR nicht erfasst. Der verkapselte Anteil wird aus dem Verhältnis der durch Doppelintegration bestimmten ESR-Signalintensitäten der Kontrolle und der Proben nach Zugabe von Natriumascorbat berechnet. Der Lipidanteil der untersuchten Liposomenformulierungen betrug 5 %.

Aus der Bestimmung ging hervor, dass die Verkapselungseffizienz von multilamellaren Liposomen größer war als die von unilamellaren Liposomen (Tab. 6). Während die Veränderung des Cholesterolanteils keine Auswirkungen auf die Verkapselungseffizienz von MLV aus DOPC/CH/PG hat, nimmt der verkapselte Anteil an CAT-1 in Liposomen aus P80/CH durch die Erhöhung des Cholesterol-Anteils von 0 % auf 30 % um ca. 10 % ab. Eine weitere Erhöhung auf 50 % führt dagegen zu keiner weiteren Abnahme. In multilamellaren Liposomen aus DPPC/CH/PG und P80H/CH führt die Veränderung des Cholesterolanteils zu uneinheitlichen Veränderungen der Verkapselungsraten. Während MLV aus DPPC/CH/PG mit einem Cholesterolanteil von 0 % bzw. 50 % eine Verkapselungseffizienz von ca. 35 % aufweisen, ist diese bei einem Cholesterolanteil von 30 % um ca. 9 % vermindert. Dagegen führt der Zusatz von 30 % Cholesterol zu den Lipidmembranen von Liposomen aus P80H/CH zu einer deutlichen Erhöhung des verkapselten Anteils, und zwar von ca. 5 % (0 % CH) bzw. 13 % (50 % CH) auf ca. 24 %. Ebenso wie multilamellare Liposomen weisen unilamellare Liposomen aus der Grundlage P80H mit einem Cholesterolanteil von 30 % in ihrer Lipiddoppelmembran die größte Verkapselungseffizienz auf. Dagegen konnten für die unilamellaren Liposomen der anderen Lipidgrundlagen deutliche Unterschiede zu den entsprechenden MLV festgestellt werden. Für DOPC/CH/PG-Liposomen, deren Verkapselungseffizienz von MLV durch den Zusatz von Cholesterol nicht beeinflusst wurde, konnte eine Abnahme des verkapselten CAT-1-Anteils durch den Zusatz von 30 % bzw. 50 % Cholesterol verzeichnet werden. Dagegen wurde die Verkapselungseffizienz von P80/CH-Liposomen durch den Zusatz von Cholesterol nur geringfügig beeinflusst. Im Gegensatz zu den MLV aus DPPC/CH/PG weisen die korrespondierenden unilamellaren Liposomen die höchste Beladung der Liposomen mit CAT-1 bei einem Cholesterolanteil von 30 % in der Membran auf.

Sowohl die multilamellaren als auch die unilamellaren Liposomen aus der kommerziellen Lipidgrundlage Presomen[®] C1 wiesen geringere Verkapselungsraten als die untersuchten eigenen Liposomengrundlagen auf.

Zur Überprüfung der Verkapselungsraten der unilamellaren Liposomen wurde deren theoretische Beladung anhand eines Nomogramms nach New [226] berechnet. Danach führt ein Lipidanteil von 5 % und eine Liposomengröße zwischen 180 und 220 nm zu einer Verkapselung von ca. 70 bis 85 % des gesamten Volumens der Zubereitung. Da diese Ergebnisse mit den eigenen Befunden nicht im Einklang stehen, sollte die Verkapselungseffizienz ausgewählter

Zubereitungen durch die Abtrennung nicht verkapselter Anteile über eine Dialyse bestimmt werden.

Tabelle. 6 Verkapselungseffizienz von CAT-1 in multilamellaren bzw. unilamellaren Liposomen mit verschiedenen Lipidgrundlagen ($\bar{x} \pm s$; $n = 3$)

Lipidgemisch	Cholesterolanteil (%)	Verkapselungseffizienz MLV (%)	Verkapselungseffizienz LUV (%)
DOPC/CH/PG	0	$25,32 \pm 0,66$	$17,36 \pm 1,88$
	30	$25,03 \pm 0,48$	$11,65 \pm 1,25$
	50	$27,39 \pm 0,67$	$11,12 \pm 0,81$
DPPC/CH/PG	0	$34,33 \pm 0,47$	$14,64 \pm 0,88$
	30	$26,47 \pm 2,05$	$16,81 \pm 0,39$
	50	$35,55 \pm 1,83$	$11,92 \pm 1,94$
P80/CH	0	$31,55 \pm 0,91$	$13,20 \pm 1,57$
	30	$21,39 \pm 1,04$	$11,70 \pm 0,69$
	50	$21,22 \pm 0,05$	$13,32 \pm 0,62$
P80H/CH	0	$4,57 \pm 0,57$	$8,9 \pm 0,54$
	30	$24,4 \pm 0,32$	$16,37 \pm 0,83$
	50	$12,91 \pm 0,73$	$9,85 \pm 1,7$
Presomen® C1	50	$10,57 \pm 1,57$	$7,43 \pm 0,38$

Die Bestimmung der Verkapselungseffizienz der untersuchten unilamellaren Liposomenformulierungen ergab eine Beladung der Liposomen mit CAT-1 zwischen 18 % und 41 % in Abhängigkeit von der Lipidgrundlage (Abb. 37). Aus diesem Bestimmungsverfahren ergeben sich somit deutlich höhere Werte der Verkapselungseffizienz als durch die Reduktion nicht verkapselter Anteile mit Natriumascorbat. Dabei ist jedoch zu beachten, dass auch aus der Kontroll-Zubereitung die gelöste Spinsonde nicht quantitativ entfernt wurde. Nach Abzug des Kontrollwertes von der Verkapselungseffizienz sind die mittels Reduktion bzw. Dialyse bestimmten Werte des verkapselten Anteils von CAT-1 in DOPC/CH/PG- bzw. DPPC/CH/PG-Liposomen vergleichbar. Dies gilt jedoch nicht für Zubereitungen aus P80, P80/CH bzw. Presomen® C1, deren durch Dialyse bestimmte Verkapselungseffizienz deutlich über den durch Reduktion bestimmten Werten liegt. Gründe dafür könnten eine erhöhte Permeabilität der Membranen dieser Liposomen für Ascorbat-Ionen oder die unvollständige Abtrennung der Spinsonde durch ionische Wechselwirkungen mit den Bestandteilen der Liposomenmembran sein. Da es sich bei P80H um Liposomen mit sehr rigiden Membranen handelt, kann die erhöhte Permeabilität für Ascorbat-Ionen nahezu ausgeschlossen werden (vgl. 3.1.3.5). Im Vergleich zu Liposomen aus DOPC/CH/PG bzw. P80H/CH weisen

Liposomen aus P80 bzw. P80H/CH kein stark verringertes Zetapotenzial auf, das für gesteigerte ionische Wechselwirkungen und die damit verbundene geringere Abtrennung der Spinsonde aus der Zubereitung verantwortlich sein könnte (Abb. 37). Es konnten ebenfalls nur sehr geringe Unterschiede zwischen den Zetapotenzialen der Liposomen vor bzw. nach der Dialyse bzw. zwischen beladenen und unbeladenen Liposomen festgestellt werden (Abb. 38). Für die erhöhten Werte der Beladungseffizienz konnte keine abschließende Erklärung gefunden werden.

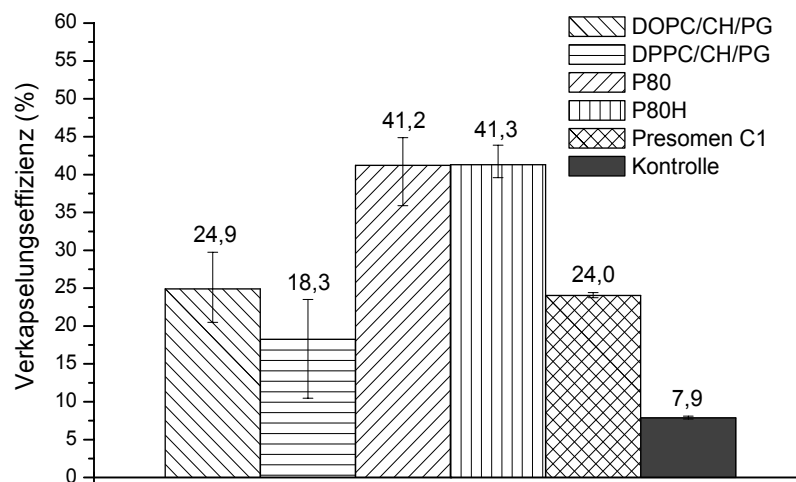


Abb. 37 Verkapselungseffizienz von CAT-1 in unilamellaren Liposomen mit verschiedenen Lipidgrundlagen ($\bar{x} \pm R$, $n = 3$)

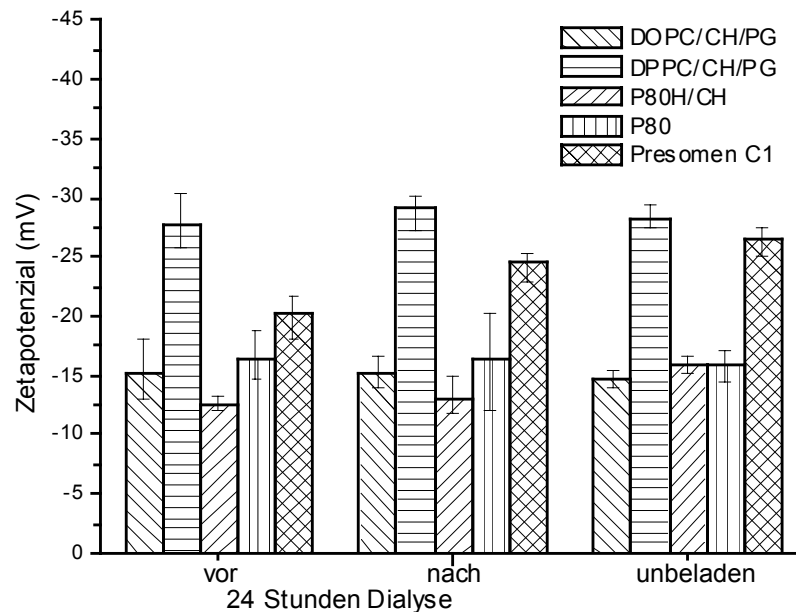


Abb. 38 Zetapotenzial von Liposomen beladen mit CAT-1 (vor und nach 24 Stunden Dialyse) bzw. unbeladen ($\bar{x} \pm R$, $n = 3$)

3.1.3.5 Freisetzung von CAT-1

Zur weiteren Charakterisierung von Liposomen, deren Einsatz in Transportstudien geplant war, sollten Untersuchungen zur Freisetzung der Nitroxidspinsonde CAT-1 aus der inneren wässrigen Phase von multilamellaren bzw. unilamellaren Liposomen mit variierenden Membranrigiditäten bei 37 °C durchgeführt werden. Die Freisetzungsgeschwindigkeit wurde anhand der Reaktion von CAT-1 und Ascorbinsäure, die der Formulierung zugesetzt wurde, bestimmt. Dabei wird davon ausgegangen, dass CAT-1 im Moment der Freisetzung durch Ascorbinsäure, die im Überschuss vorliegt, reduziert wird und Ascorbinsäure, wie bereits in der Literatur beschrieben [255], nicht in der Lage ist, die Liposomenmembran zu überwinden. Der Verlauf der Reaktion und die Abhängigkeit vom Cholesterolgehalt der Liposomenmembran ist in Abb. 39 exemplarisch für multilamellare Liposomen aus der Lipidgrundlage DPPC/CH/PG dargestellt.

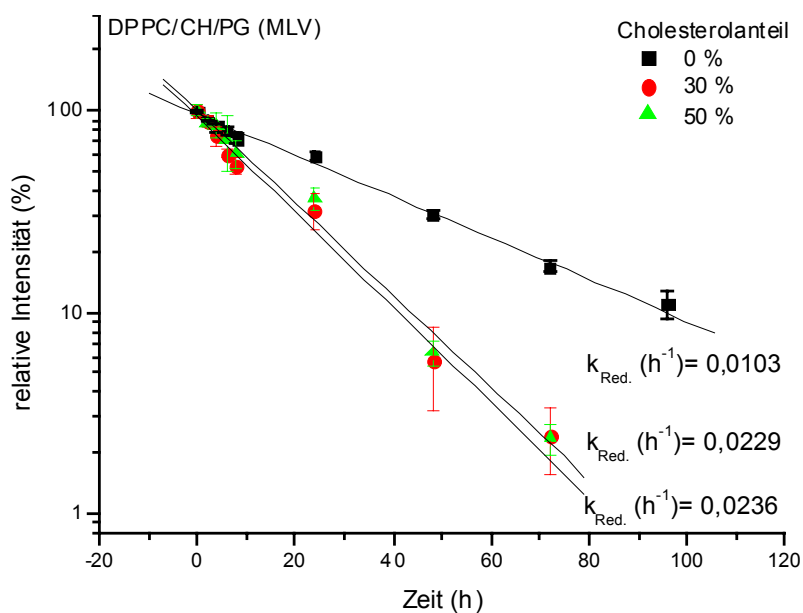


Abb.39 Abhängigkeit der ESR-Signalintensität von CAT-1 verkapselt in multilamellaren DPPC/CH/PG-Liposomen von der Zeit nach Zugabe einer Natriumascorbat-Lösung ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Die entsprechenden Geschwindigkeitskonstanten ($k_{\text{Reduktion}}$) wurden nach logarithmischer Darstellung der relativen Signalintensitäten durch lineare Kurvenanpassung bestimmt. Der Korrelationskoeffizient der Anpassungen lag in der Regel zwischen 0,978 und 0,999.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Reduktionskonstanten von CAT-1 in Zubereitungen aus DOPC/CH/PG bzw. P80 deutlich größer sind als die Reduktionskonstanten in Zubereitungen aus DPPC/CH/PG bzw. P80H/CH (Abb. 40). Demzufolge erfolgt eine schnellere Freisetzung der Spinsonde aus Liposomen mit fluiden Membranen im Vergleich zu Liposomen, deren Membranen rigide sind (vgl. 3.1.2.2).

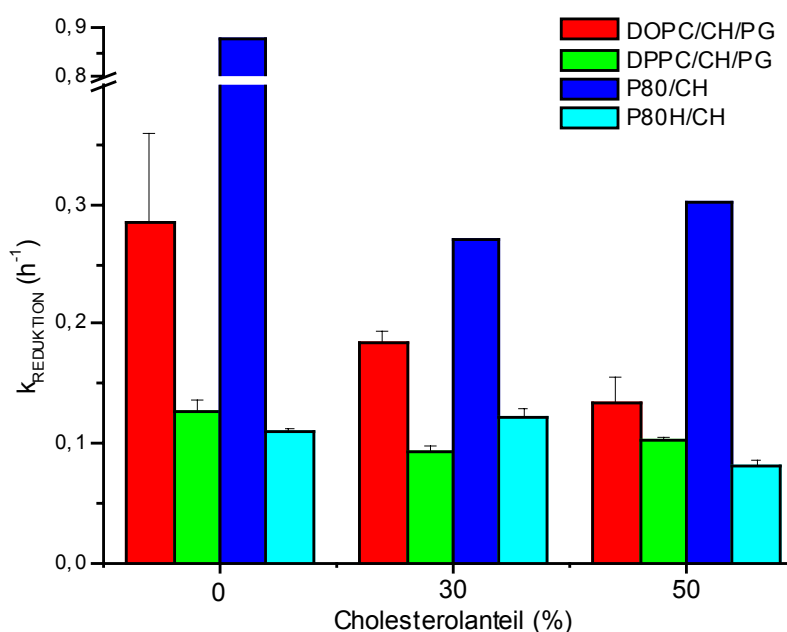


Abb. 40 Abhängigkeit der Reduktionsrate ($k_{\text{Reduktion}}$ (h⁻¹) von CAT-1 verkapselt in unilamellaren Liposomen vom Cholesterol-Gehalt der Liposomenmembran

In Kapitel 3.1.2.2 wurde der Einfluss von Cholesterol auf die Lipidmembran anhand der Polarisationsindizes P von DPH bzw. DPH-TMA untersucht. Dabei wurde mit steigendem Cholesterolgehalt der Membranen eine Zunahme der Polarisationsindizes und der damit verbundenen Membranrigidität von DOPC/CH/PG bzw. P80 beobachtet. Die Polarisationsindizes der Fluoreszenzmarker in DPPC/CH/PG- bzw. P80H/CH-Liposomen wurden dagegen nur geringfügig verändert. Mit zunehmendem Cholesterolanteil wird auch die Freisetzung von CAT-1 aus DOPC/CH/PG- bzw. P80-Liposomen vermindert. Die korrespondierenden Reduktionskonstanten sind entsprechend kleiner als die Reduktionskonstanten von CAT-1 in Cholesterol-freien Liposomen. Die Reduktionskonstanten von CAT-1 in DPPC/CH/PG- bzw. P80H/CH-Zubereitungen blieben dagegen, in Analogie zu den Polarisationsindizes durch den steigenden Cholesterolanteil nahezu unverändert. Durchgeführte lineare Regressionsanalysen mit der Einflussgröße P_{DPH} bzw. $P_{\text{DPH-TMA}}$ und $k_{\text{Reduktion}}$ als Zielgrößen bestätigen für einige

Zubereitungen den Einfluss der Membranrigidität auf die Freisetzung bzw. Reduktion von CAT-1.

Für Zubereitungen mit der Lipidgrundlage DOPC/CH/PG konnte in Abhängigkeit von der Einflussgröße P_{DPH} bzw. $P_{DPH-TMA}$ eine gute ($R = 0,967$) bzw. sehr gute ($R = 0,999$) Korrelation^b ermittelt werden (Abb. 41). Die Regressionsanalysen der Zubereitungen aus DPPC/CH/PG bzw. P80H/CH belegen eine sehr schlechte Korrelation für die Einflussgröße $P_{DPH-TMA}$ ($R = 0,130$) bzw. schlechte Korrelation für P_{DPH} ($R = 0,580 - 0,696$). Dagegen ist die mäßige Korrelation für Zubereitungen aus P80/CH unabhängig von der Einflussgröße ($R = 0,750 - 0,793$).

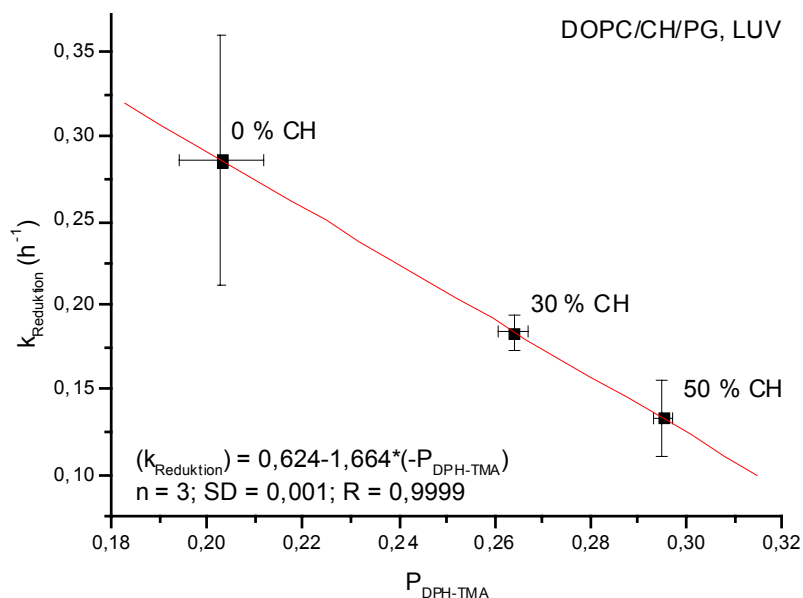


Abb. 41 Regressionsanalyse zur Reduktion von CAT-1 in Formulierungen mit unilamellaren DOPC/CH/PG-Liposomen (Cholesterolanteil 0, 30 bzw. 50 %): Einflussgröße $P_{DPH-TMA}$, Zielgröße $k_{\text{Reduktion}}$

Der Vergleich von unilamellaren und multilamellaren Liposomen zeigt, dass die Freisetzung von CAT-1 aus multilamellaren Liposomen deutlich langsamer verläuft (Abb. 42). Dieses kann auf die höhere Anzahl an Lipidlamellen in multilamellaren Liposomen und die damit

^b Die Korrelation wird als Korrelationskoeffizient R ausgedrückt, der ein Maß für die Abhängigkeit zwischen P_{DPH} bzw. $P_{DPH-TMA}$ und $k_{\text{Reduktion}}$ ist, wobei R zwischen 0 (keine Korrelation) und 1 (vollständige Korrelation) liegen kann.

erhöhte Anzahl an Permeationsbarrieren für CAT-1 zurückgeführt werden.

Für multilamellare Liposomen der Grundlage DOPC/CH/PG konnte ebenfalls die gute Korrelation zwischen P_{DPH} bzw. $P_{DPH-TMA}$ und $k_{Reduktion}$ nachgewiesen werden ($R = 0,895$ bzw. $0,979$). Auch für die anderen Grundlagen wurden die an unilamellaren Liposomen erzielten Ergebnisse bestätigt, wobei für Zubereitungen aus DPPC/CH/PG bzw. P80H/CH für $P_{DPH-TMA}$ etwas höhere Korrelationskoeffizienten ($R = 0,827$ bzw. $0,859$) ermittelt wurden.

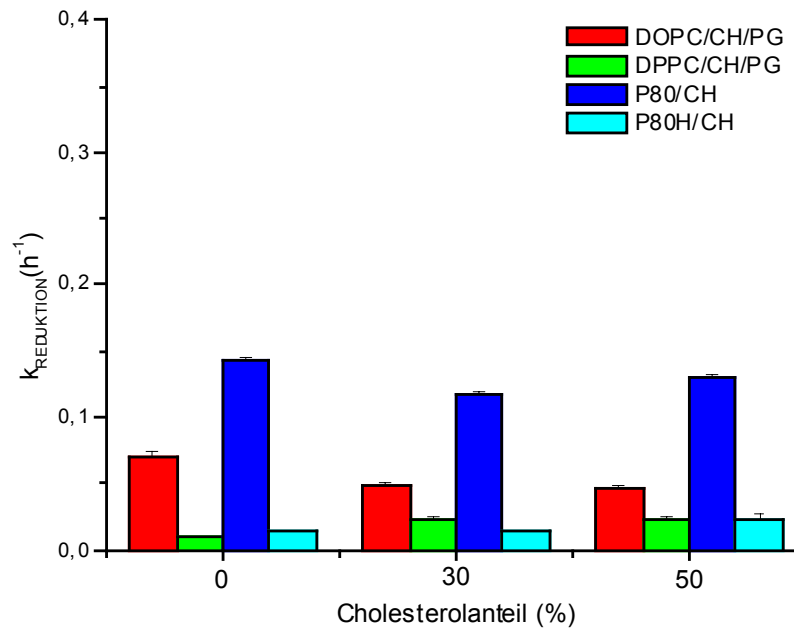


Abb. 42 Abhängigkeit der Reduktionsrate ($k_{Reduktion}$ in h^{-1}) von CAT-1 verkapselt in multilamellaren Liposomen vom Cholesterol-Gehalt der Liposomenmembran

3.1.4 Diskussion

Zunächst wurden Liposomen für den Einsatz in Transportstudien mit dem Verfahren der Membranextrusion hergestellt, und ihre Eigenschaften in Abhängigkeit von der Zusammensetzung der Lipidmembranen charakterisiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass ein zunehmender Anteil von Phosphatidylglycerol in der Membran nicht nur zu einer Absenkung des Zetapotenzials, sondern z. T. auch zu einer Verminderung des Durchmessers der extrudierten Liposomen führt. Steigende Cholesterolanteile ziehen dagegen eine Zunahme der Liposomendurchmesser nach sich und führen darüber hinaus zu Änderungen der Viskosität der

Lipiddoppelmembranen. Während Cholesterol auf die Membran von Liposomen aus nicht hydrierten Phospholipiden einen kondensierenden Effekt ausübt, durch den die Membranviskosität zunimmt, haben steigende Cholesterolanteile in Liposomen aus hydrierten Phospholipiden eine Abnahme der Membranviskosität zur Folge. Die Größe der Liposomen ist nicht nur über die Zusammensetzung ihrer Lipidmembranen, sondern vor allem über die Porengröße der zur Extrusion verwendeten Membranfilter steuerbar. Einen nur geringen Einfluss auf die Durchmesser der extrudierten Liposomen hat dagegen der Anteil der Lipidgrundlage in der Formulierung. Der Liposomendurchmesser steigt erst mit einer stark eingeschränkten Extrusionsfähigkeit der Formulierungen an.

Für die Untersuchungen mit Hilfe der ESR-Spektroskopie und Tomografie wurden die Nitroxylradikale CAT-1, TEMPO, ^{15}N -TEMPO, TEMPOL, TEMPOL-benzoat und 5-Doxylpalmitinsäure ausgewählt. Die Beladungsfähigkeit der Liposomen mit ESR-Spinsonden ist stark abhängig von deren Hydro-/ Lipophilie und für die lipophile Spinsonde TEMPOL-benzoat stark eingeschränkt. Die Beladung der Liposomen mit Spinsonden hat Änderungen ihrer Durchmesser und Zetapotenziale zur Folge, deren Richtung von der ausgewählten Liposomengrundlage und der ESR-Spinsonde abhängig ist. Die Kurzzeitstabilität von Liposomen wird durch die Beladung nicht verändert. Als limitierender Faktor für die Lagerung der beladenen Liposomen ist dagegen die Stabilität der ESR-Spinsonden in den Formulierungen anzusehen.

Zur weiteren Charakterisierung der Liposomen, deren Einsatz in Transportstudien geplant war, wurden die Verkapselungseffizienz von CAT-1 und die Freisetzung der Spinsonde in Abhängigkeit von der Lamellarität und den Membraneigenschaften der Vesikel bestimmt. Die Verkapselungseffizienz der Spinsonde ist in multilamellaren Liposomen erwartungsgemäß höher als in unilamellaren Liposomen und wird durch den Gehalt an Cholesterol in den Lipidmembranen nicht beeinflusst. Dagegen konnte eine mit steigendem Cholesterolanteil verminderte Freisetzungsgeschwindigkeit der Spinsonde aus Liposomen mit nicht hydrierten Phospholipiden nachgewiesen werden. Die Freisetzung von CAT-1 ist aus Liposomen, deren Membranen aus nicht hydrierten Phospholipiden bestanden, gegenüber solchen, deren Membranen aus hydrierten Phospholipiden bestanden, generell erhöht.

3.2 Stabilität von Liposomen nach epikutaner und subkutaner Applikation

Seit die Erforschung der Wechselwirkungen zwischen Liposomen und Haut mit den Arbeiten von Mezei und Gualeskham [257] begann, steht die Penetrationsverstärkung von hydro- und lipophilen Wirkstoffen durch Liposomen bzw. Phospholipide im Vordergrund des Interesses. Neben dem Einfluss der Zusammensetzung der Lipidmembranen auf die Wirkstoffpenetration wurde untersucht, ob Liposomen intakt in die Haut penetrieren können.

Ähnlich wie Mezei und Gualeskham, die die verwendeten Liposomen als „Transdermale Transporter“ bezeichneten, gingen auch andere Autoren von einer Penetration intakter Vesikel aus [36, 53 - 55]. Unter der Annahme, dass intakte Liposomen das SC nicht im nennenswerten Umfang penetrieren können, lassen sich für ihr Verhalten zunächst folgende Möglichkeiten diskutieren:

- a) Verbleiben intakter Liposomen auf der Hautoberfläche
- b) Fusion kleiner Liposomen zu größeren Vesikeln und Ausbildung multilamellarer Lipidstapel aufgrund des Wasserverlustes unter Veränderung des Dispersitätsgrades der ursprünglichen Liposomen und ggf. partieller Freigabe des Inhalts
- c) Fusion liposomaler Lipidkomponenten mit den Lipiddoppelschichten des Stratum corneum.

Andere Autoren bestreiten sowohl eine Penetration intakter Vesikel, als auch die Penetration einzelner Phospholipide [258, 259]. Die Möglichkeit einer molekulardispersen Penetration einzelner Membranbestandteile in das Stratum corneum und eine sich anschließende erneute Ausbildung von Liposomen kann nach Artmann et al. [260] bislang jedoch weder ausgeschlossen noch bestätigt werden.

Bis heute bleibt die Frage strittig, ob Liposomen intakt in das Stratum corneum penetrieren können oder ob sie an der Oberfläche zerfallen und im Anschluss daran nur die liposomalen Lipide in die Haut eindringen. *In der folgenden Versuchsreihe sollte ein Beitrag zur Klärung der Frage nach der Integrität von epikutan applizierten Liposomen geleistet werden.*

3.2.1 Integrität von Liposomen nach epikutaner Applikation in Abhängigkeit von der Lamellarität und Zusammensetzung ihrer Lipidmembranen

Neben der Frage der Integrität, sollte auch die Frage nach dem Einfluss der Lamellarität und der Zusammensetzung der Lipidmembranen auf die Stabilität von Liposomen nach epikutaner Applikation untersucht werden.

Für die Untersuchungen wurden multi- und unilamellare Liposomen aus DOPC, DPPC und DPPG, sowie 0, 30 bzw. 50 mol % Cholesterol hergestellt. Die Hydratisierung der Lipidgrundlagen erfolgte mit einer Lösung aus CAT-1 (20 mM) in Phosphatpuffer (vgl. 3.1).

Vor der epikutanen Applikation der Zubereitungen, wurden diese mit einer isoosmolaren Lösung aus Natriumascorbat versetzt. CAT-1 wird nach der Freisetzung aus den Liposomen durch Ascorbat-Ionen zu dem entsprechenden Hydroxylamin reduziert, dass mit der ESR nicht erfasst werden kann. Aus der Intensitätsabnahme der ESR-Signale kann auf die Freisetzung von CAT-1 bzw. den Integritätsverlust der Vesikel geschlossen werden.

Vorversuche mit humaner Vollhaut ergaben Spektren mit schlechten Signal-Rausch-Verhältnissen, die auf die apparativen Bedingungen und die Signaldämpfung durch den hohen Wassergehalts der Hautproben zurückgeführt wurden (vgl. 5.2.1.). Alle Versuche wurden daher an hitzeseparierter Epidermis durchgeführt, bei der die genannten Probleme nicht auftraten. Die Applikation der Probe erfolgte auf das Stratum corneum. Die entsprechenden Reduktionskonstanten bzw. Freisetzungsgeschwindigkeiten von CAT-1 ($k_{\text{Reduktion}}$) wurden durch lineare Kurvenanpassung bestimmt.

Nach der Applikation der Zubereitungen auf das Stratum corneum konnte eine Abnahme der ESR-Signalintensitäten festgestellt werden. Die Abnahme erfolgt nach einer Reaktion nullter Ordnung und belegt die Freisetzung von CAT-1 bzw. den Integritätsverlust der Vesikel. In Abhängigkeit vom Cholesterolgehalt, der Lamellarität und der Auswahl der Phospholipidgrundlage traten z.T. deutliche Unterschiede zwischen den Freisetzungsgeschwindigkeiten von CAT-1 in den einzelnen Zubereitungen auf (Abb. 43).

Die Freisetzungsrate von CAT-1 aus unilamellaren DOPC/CH/PG-Liposomen blieb mit steigendem Cholesterolanteil in der Lipiddoppelmembran nahezu unverändert in einem Be-

reich von 0,86 bis 0,93 %/min. Dagegen konnte nach der Erhöhung des Cholesterolanteils von 0 % auf 30 % eine Abnahme der Freisetzungsgeschwindigkeit von CAT-1 aus unilamellaren DPPC/CH/PG-Liposomen festgestellt werden. Die weitere Steigerung des Cholesterolanteils auf 50 % führte jedoch nicht zu einer weiteren Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit, sondern zu deren Erhöhung.

Die Verkapselung von CAT-1 in multilamellaren Liposomen führt im Vergleich zu unilamellaren Liposomen zu deutlich verminderten Reaktionsgeschwindigkeiten, woraus auf eine erhöhte Stabilität der Vesikel auf dem Stratum corneum geschlossen werden kann.

Während die Reduktionskonstanten von DPPC/CH/PG-Liposomen durch die Veränderung des Cholesterolanteils nahezu unverändert blieben, stieg die Reduktionsgeschwindigkeit von CAT-1 durch den Zusatz von 30 % Cholesterol zur Lipidmembran von DOPC/CH/PG-Liposomen stark an. Mit der weiteren Erhöhung des Cholesterolanteils auf 50 % nahm die Reduktionsgeschwindigkeit wieder ab.

Im Gegensatz zu den unter 3.1.3.5 durchgeführten Untersuchungen konnte kein einfacher Zusammenhang zwischen der Membranrigidität der Liposomen und der Reduktionsgeschwindigkeit von CAT-1 hergestellt werden. Für die Freisetzung von CAT-1 aus Liposomen auf dem Stratum corneum sind wahrscheinlich weitere Einflussfaktoren wie z. B. der Wasserverlust aus der Zubereitung von größerer Bedeutung.

Als Ergebnis der durchgeführten Untersuchungen kann festgestellt werden, dass Liposomen unabhängig vom Cholesterol-Gehalt ihrer Membranen bzw. ihrer Lamellarität, nach ihrer epikutanen Applikation keinen dauerhaften Einschluss der Spinsonde CAT-1 gewährleisten. Deren Reduktion zum korrespondierenden Hydroxylamin belegt, dass ein Austausch von CAT-1 bzw. Ascorbat-Ionen zwischen der inneren und äußeren wässrigen Phase von Liposomen stattfindet. Es kann daher die Schlussfolgerung gezogen werden, dass Vesikel mit zunehmendem Wasserverlust aus der Zubereitung ihre Integrität und Vesikelstruktur verlieren und in der Folge ein Lipidfilm auf der Haut entsteht. Letzteres wird durch die Befunde anderer Arbeitsgruppen bestätigt [184, 261, 262]. Als Grund für die Reorganisation der Lipide und die Fusion von Liposomen zu mehrschichtigen Lipidlamellen wird der Phasenübergang von L_{α} zu L_{β} genannt, der eintritt, wenn der Wassergehalt der Zubereitung unter 45 % absinkt [165, 263]

In welchen Ausmaß der Zusatz von Natriumascorbat zur äußeren wässrigen Phase von Liposomen die Ergebnisse der durchgeführten Untersuchungen beeinflusst hat, sollte durch einen neu entwickelten alternativen Versuchsansatz nachfolgend geklärt werden.

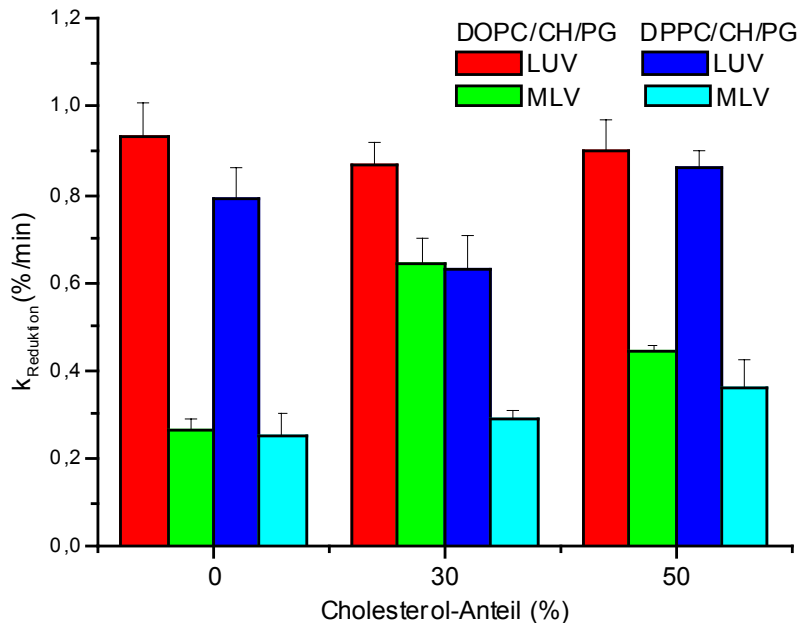


Abb. 43 Abhängigkeit der Reduktionskonstanten $k_{\text{Reduktion}}$ (%/min) von CAT-1 vom Cholesterolanteil der Membranen von unilamellaren bzw. multilamellaren Liposomen der Grundlagen DOPC/CH/PG bzw. DPPC/CH/PG ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

3.2.2 Stabilität von multilamellaren Liposomen aus hydrierten Phospholipiden nach epikutaner bzw. subkutaner Applikation

In dieser Versuchsreihe sollte insbesondere nicht invasiv in vivo untersucht werden, wie lange intakte Liposomen als Wirkstoffdepot auf bzw. in der Haut zur Verfügung stehen, und in welchem Maß die Spinsonde CAT-1 aus diesem Depot an die Umgebung abgegeben wird. Dabei wurde ein neuer Versuchsansatz entwickelt, mit dem die Integrität von Liposomen ohne den Zusatz von Reduktionsmitteln wie z. B. Natriumascorbat zur äußeren Phase der Liposomen nachgewiesen werden kann. Durch diesen alternativen Untersuchungsansatz sollte eine mögliche Destabilisierung der Liposomen durch Bestandteile ihrer äußeren Phase vermieden werden. Der Einfluss des Wasserverlusts aus der Zubereitung auf die Freigabe von CAT-1 wurde durch einen Vergleich von okklusiver und nicht okklusiver Applikation bestimmt.

Inwieweit die Depotwirkung von der Auswahl der Liposomengrundlage abhängt, sollte an-

hand eines Vergleichs von liposomalen Formulierungen aus hydriertem Ei-Lecithin bzw. aus Dipalmitoylphosphatidylcholin jeweils mit Cholesterol-Zusatz untersucht werden. Eine vergleichende Versuchsreihe mit den entsprechenden CAT-1-Lösungen als Referenzsystem wurde durchgeführt. Die Vergleichbarkeit von *In-vivo*- und *In-vitro*-Ergebnissen sollte anhand von Versuchen mit exzidiierter Haut von Nacktmäusen überprüft werden. Als Referenz zu den Untersuchungen an Haut dienten Untersuchungen an einem Modell. Dieses bestand aus einem Polycarbonatfilter mit einer Porengröße von 50 nm, der als Penetrationsbarriere für die applizierten multilamellaren Liposomen diente, und einem darunter liegenden Agarosegel als Akzeptormedium für freigesetztes CAT-1.

Des weiteren ist eine Charakterisierung der Integrität von multilamellaren Liposomen nach deren subkutaner Injektion *in vivo* durchgeführt worden. Diese sollte Aufschluss über den Abbau von Vesikeln in der Haut und die Bedeutung der Liposomenstruktur für den Depoteffekt von subkutan applizierten Liposomen geben. Ein Vergleich mit CAT-1-Lösungen diente auch hier als Referenz. Die subkutane Applikation von Liposomen ist in sehr unterschiedlichen Bereichen der Pharmakotherapie von Interesse. Sie erlaubt ein Targeting der Lymphknoten, das insbesondere für die Behandlung mit Zytostatika, sowie antibakteriellen und antiviralen Wirkstoffen von Interesse ist [264]. Darüber hinaus werden weitere Einsatzgebiete für subkutan applizierte Liposomen erforscht, z. B. die Vakzinierung und Rheumatherapie, mit dem Ziel einer verlängerten Antigenpräsenz bzw. lokalen Wirkstofffreisetzung [265, 266]

Methodische Grundlagen zur Bestimmung der Integrität von Liposomen. In Kapitel 4.2.1 wurde der Zerfall von Liposomen nach epikutaner Applikation in Abhängigkeit vom Cholesterolgehalt bzw. der Lamellarität ihrer Membranen nachgewiesen. Der Nachweis des Integritätsverlusts erfolgte indirekt über die Reduktion freigesetzter Spinsondenanteile durch Reduktion zum diamagnetischen Hydroxylamin und die Bestimmung der Abnahme der Signalintensität nach Doppelintegration. Diese Methode erlaubt jedoch keine Differenzierung zwischen der Reduktion von Spinsonden nach deren Freisetzung aus den Liposomen und der Reduktion im Inneren von Liposomen nach dem Eindringen von Ascorbatanionen. Es sollte daher eine Methode auf diese Problematik angewendet werden, bei der eine direkte nichtinvasive Unterscheidung zwischen freigesetzten und verkapselten Anteilen von CAT-1 möglich ist. Die Grundlagen der angewendeten Methode sollen nachfolgend kurz erläutert werden.

In Abb. 44 sind die Veränderungen der Linienbreiten und der Formen von ESR-Spektren in der Folge von konzentrationsabhängigen Wechselwirkungen zwischen Spinsondenmolekülen dargestellt. Dabei liegen der Zunahme der Linienbreite und dem sich anschließenden Übergang des Signal-Tripletts in ein Singulett im wesentlichen zwei Wechselwirkungsmechanismen zugrunde:

I. Dipol-Dipol-Wechselwirkung zwischen den magnetischen Momenten der Elektronen führen zu einer Verbreiterung der Hyperfeinlinien um ΔH_d . ΔH_d ist umgekehrt proportional zur dritten Potenz des mittleren Radikalabstandes $r(\Delta H_d \sim 1/r^3)$, der mit steigender Konzentration sinkt.

II. Spin-Austauschwechselwirkungen liegt ein Nahwirkungsmechanismus zugrunde, der nur bei Überlappung der 2p π Orbitale auftritt, d. h. wenn sich die Radikale bis auf einen kritischen Abstand $d_c \sim 1$ nm nähern. Zwei Grenzfälle lassen sich unterscheiden:

Schwache Wechselwirkungen: Die drei Komponenten des ESR-Spektrums werden um einen Betrag ΔH_{ex} verbreitert. Diese Verbreiterung ist ein direktes Maß für die Spin-Austauschfrequenz.

Starke Wechselwirkung: Die drei Komponenten sind zu einer Linie im Zentrum des Spektrums zusammengelaufen. Die Linie hat Lorentzform. Die Linienbreite ΔH ist durch die ursprüngliche Hyperfeinlinienaufspaltung a_H und durch die Austauschfrequenz W_{ex} bestimmt: $\Delta H \sim a_H^2 / \Delta W_{ex}$ [267].

Im mittleren Bereich der Wechselwirkungen liegen intermediäre Zustände der beiden Wechselwirkungen und Spektrenformen vor (Abb. 44).

Die Abhängigkeit der Heisenberg-Spin-Austauschrate von der Konzentration der Spinsonde CAT-1 wurde mit Hilfe eines Simulationsprogramms zur Anpassung von magnetischen Resonanzspektren [49] bestimmt und ist in Abb. 45 dargestellt. Parallel zum Spinaustausch nimmt aufgrund der zunehmenden Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Radikalen bzw. Bestandteilen der Lösung die berechnete Mobilität der Spinsonde ab.

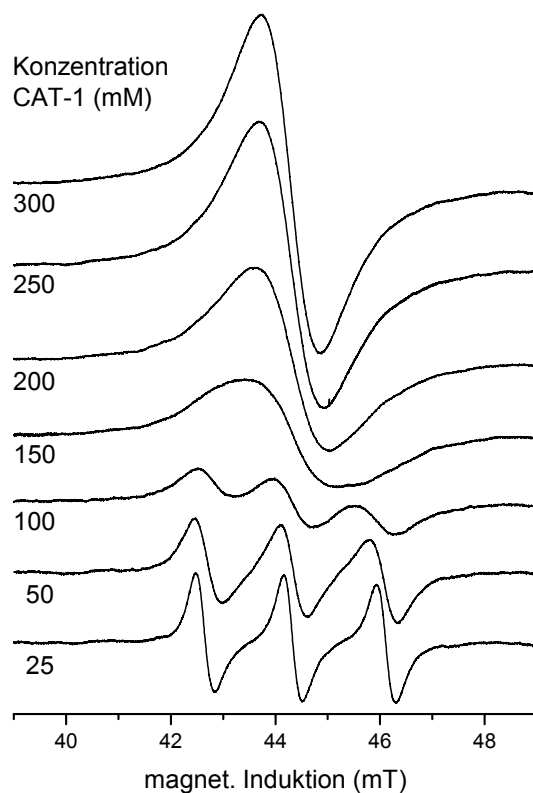


Abb. 44 L-Band-ESR-Spektren der Spinsonde CAT-1 in Abhängigkeit von der Spinsondenkonzentration

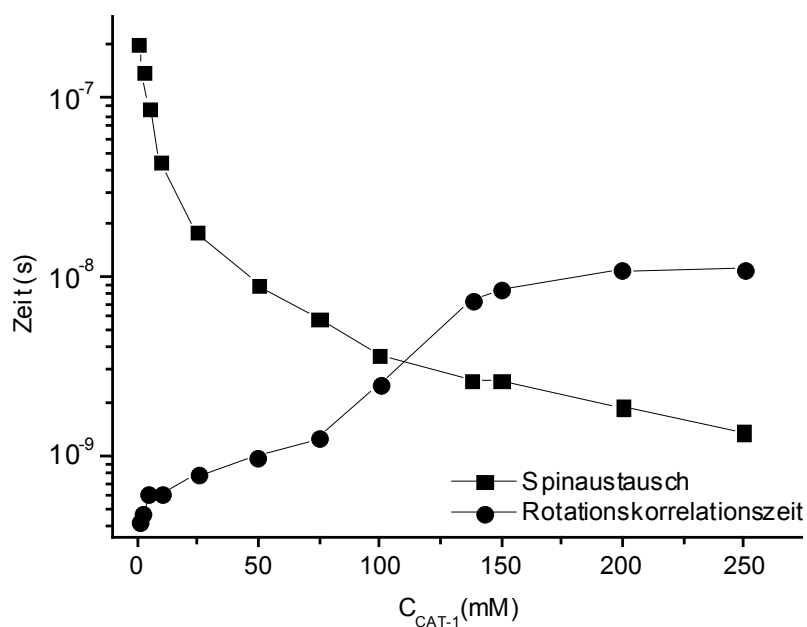


Abb. 45 Abhängigkeit des berechneten Spinaustauschs und der Rotationskorrelationszeit von der Konzentration der Spinsonde CAT-1

Die Linienbreiten der in Abb. 44 dargestellten ESR-Spektren wurden mit Hilfe eines Simula-

tionsprogramms zur Anpassung von isotropen ESR-Spektren (ISOTROP) bestimmt und sind in Tabelle 7 aufgeführt. Bei den angegebenen Linienbreiten handelt es sich um summarische Linienbreiten, bei denen die einzelnen Effekte, die sich auf die Linienbreiten auswirken, nicht separat erfasst werden. Die Linienbreiten sind stark konzentrationsabhängig.

Tabelle.7 Linienbreiten der in Abb. 44 dargestellten ESR-Spektren

CAT-1-Konzentration (mM)	Linienbreite Komponente 1 (mT)	Linienbreite Komponente 2 (mT)
25	0,357	--
50	0,567	--
100	0,9429 (64 %)	1,602 (36 %)
150	1,734	--
200	1,464	--
250	1,289	--
300	1,1932	--

Während es sich bei den ESR-Spektren von hoch konzentrierten Lösungen, in denen die Spinsonden untereinander starke Spin-Austauschwechselwirkungen aufweisen, um ein Singulett handelt, tritt mit zunehmender Verdünnung der Spinsondenlösung und der damit einhergehenden Abnahme der Wechselwirkungsintensität der Übergang zu einem Drei-Linien-Spektrum ein. Abnehmende Spinsondenkonzentrationen in hochkonzentrierten Lösungen führen zu einer Zunahme der Linienbreite des Singulett, bis der Grenzbereich erreicht ist, in dem das registrierte Gesamtspektrum aus der Überlagerung eines Singulett und eines Triplett besteht (vgl. Tab. 7, 100 mM). In CAT-1-Lösungen, in denen die Spinsonde in Konzentrationen unter 100 mM vorliegt, nimmt die Linienbreite der ESR-Signale mit fallender Konzentration ab.

Werden hoch konzentrierte CAT-1-Lösungen (> 100 mM) im Inneren von Liposomen verkapselt, kann die Freisetzung der Spinsonde in die äußere wässrige Phase direkt verfolgt werden. Dieses wird dadurch möglich, dass die Spinsonde in der äußeren Phase in sehr geringen Konzentrationen vorliegt, und das ESR-Spektrum aufgrund stark verminderter Spin-Austauschwechselwirkungen und Dipol-Dipol-Wechselwirkungen von einem Singulett in ein Triplett übergeht. Die Quantifizierung der Singulett- und Triplett-Anteile eines Spektrums gibt Auskunft über das Ausmaß der Freisetzung und erfolgte ebenso wie die Auswertung der spektralen Eigenschaften, wie z. B. der Linienbreiten, mit Hilfe des Simulationsprogramms

ISOTROP.

Die Genauigkeit, mit der die Flächenanteile einzelner Komponenten in den aufgezeichneten Spektren ermittelt werden können, wurde zunächst anhand von Modellspektren überprüft. Dazu wurden die gemessenen L-Band-ESR-Spektren von CAT-1-Lösungen der Konzentrationen 138 mM bzw. 25 mM in den Verhältnissen 9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 4:6, 3:7, 2:8, und 1:9 zu einem Gesamtspektrum überlagert. Für die durchgeführten *In-vivo*-Versuche wurde ein Standard aus 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) verwendet, dessen Singulett-Spektrum in einer weiteren Reihe von Modellspektren als dritte Komponente mit einem gleichbleibenden Anteil von 3 % berücksichtigt wurde. Die erhaltenen Modellspektren wurden mit ISOTROP ausgewertet, und die ermittelten Flächenanteile gegen die Sollwerte des Anteils der Komponente aufgetragen, die in einer Konzentration von 25 mM vorlag (Abb. 46 und 47). Aus den durchgeführten Berechnungen der Anteile ergaben sich maximale Abweichungen von 9,3 % für Spektren, die aus zwei Komponenten zusammengesetzt waren. Erwartungsgemäß waren die ermittelten maximalen Abweichungen vom Sollwert für Spektren, aus denen drei Komponenten bestimmt werden mussten, höher (17,3 %).

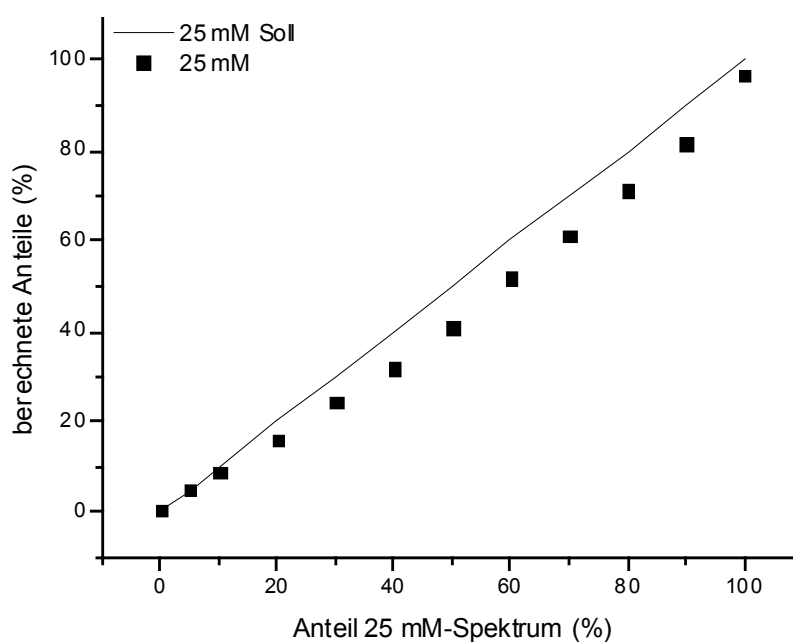


Abb. 46 Mit ISOTROP berechneter Anteil des Spektrums einer CAT-1-Lösung (25 mM) in Abhängigkeit vom Anteil am Modellspektrum (Soll)

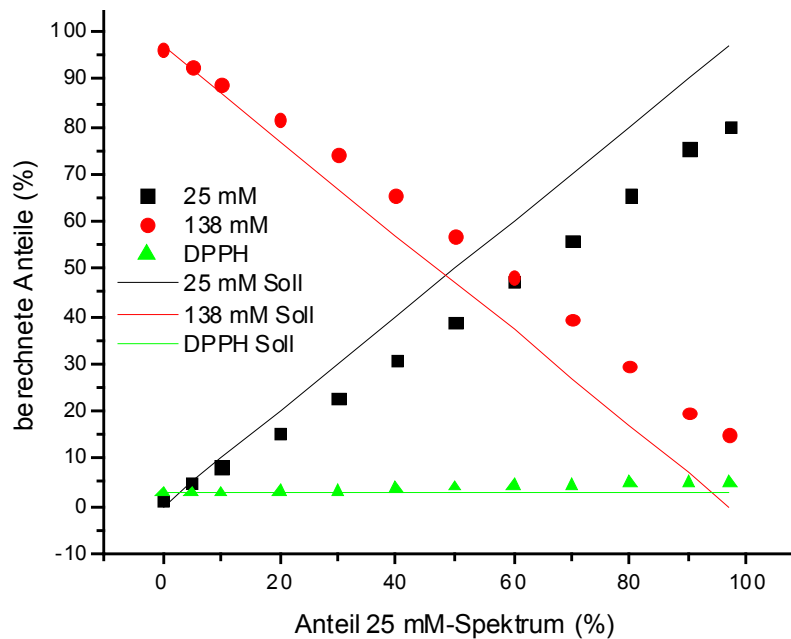


Abb. 47 Mit ISOTROP berechnete Anteile der Komponenten eines Spektrums in Abhängigkeit vom Anteil des Spektrums einer CAT-1-Lösung (25 mM) am Modellspektrum

Bei der Durchführung von Untersuchungen an der Haut wurde neben der Freisetzung von Spinsonden aus Liposomen auch die ESR-Signalintensität nach Doppelintegration bestimmt, die gab Aufschluss über die Reduktion von CAT-1 zum diamagnetischen Hydroxylamin gab.

Liposomen aus Presomen® C1 und Presomen® PPG-I. Zur Untersuchung der Stabilität von Liposomen nach epikutaner und subkutaner Applikation wurden Liposomen aus den Grundlagen Presomen® C1 und Presomen® PPG-I verwendet (vgl. 3.1.1). Die Herstellung der multilamellaren Liposomen erfolgte über die Frier-Tau-Methode (vgl. 3.1) nach Hydratisierung der Lipidgrundlagen mit CAT-1-Lösungen (138 mM). Der Lipidgehalt der Formulierungen betrug 10 %. Nicht verkapselte Anteile der Spinsonde wurden durch dreimalige Zentrifugation der Zubereitung, Austausch des jeweiligen Überstandes und Ergänzung des Volumens mit isoosmolarem Phosphatpuffer entfernt. Aus Liposomen, die in Vorversuchen aus nicht hydrierten Phospholipiden hergestellt wurden, konnten unverkapselte Anteile der Spinsonde durch Zentrifugation bzw. Dialyse nur unvollständig entfernt werden. Auf den Einsatz der Lipidgrundlagen DOPC bzw. P80 wurde daher verzichtet.

Die mit Hilfe der Laserdiffraktometrie bestimmte Größenverteilung der Liposomen aus

Presomen[®] PPG-I zeigt zwei Maxima und zwar bei 0,432 und 1,919 μm . Der überwiegende Teil der Liposomen (99 %) war kleiner als 2,549 μm . Liposomen aus Presomen[®] C1 zeigten ebenfalls eine bimodale Verteilung mit Maxima bei 0,755 und 1,919 μm . 99 % der Liposomen aus Presomen[®] C1 hatten einen Durchmesser, der kleiner war als 2,933 μm und 40 % wiesen einen Durchmesser von weniger als 0,452 μm auf. Nach Oussoren [264] werden Liposomen mit Größen zwischen 0,04 und 0,40 μm potentiell in das Lymphsystem aufgenommen und im Körper verteilt. Dabei hängt die Aufnahmeeffizienz von der Liposomengröße ab. Da nur 10 % der Liposomen aus Presomen[®] C1 Durchmesser aufweisen, die kleiner sind als 0,40 μm , wird mit einer verminderten Aufnahme dieser Vesikel in das Lymphsystem gerechnet, was bei der Untersuchung der Verteilung von subkutan applizierten Liposomen im Körper von Bedeutung ist (vgl. 3.2.2.4).

Die Verkapselungseffizienz der Liposomen lag bei $52,84 \pm 0,11$ % (Presomen[®] PPG-I) bzw. $51,8 \pm 0,89$ % (Presomen[®] C1).

Die Auswertung der Linienbreiten sowie der verkapselten und freigesetzten Anteile von Spinsonden in Liposomenzubereitungen erfolgte in allen nachfolgenden Untersuchungen exemplarisch anhand der ESR-Spektren, die nach der epikutanen bzw. subkutanen Applikation von CAT-1 in Presomen[®] PPG-I-Liposomen registriert wurden.

3.2.2.1 Freisetzung von CAT-1 aus Presomen[®] C1 bzw. Presomen[®] PPG-I-Liposomen

In der folgenden Untersuchung sollte zunächst überprüft werden, ob die Freisetzung von CAT-1 aus multilamellaren Liposomen, die mit hochkonzentrierten Lösungen der Spinsonde (138 mM) beladen wurden, anhand der spektralen Veränderungen der zugehörigen ESR-Spektren ohne Aufarbeitung der Probe kontinuierlich verfolgt werden kann. Weiterhin sollte untersucht werden, ob das unter 3.2.1 zur Reduktion von freigesetztem CAT-1 verwendete Natriumascorbat die Freisetzung der Spinsonde aus den multilamellaren Liposomen verändert. Dazu wurden Liposomen aus den Lipidgrundlagen Presomen[®] C1 bzw. Presomen[®] PPG-I nach der unter 7.1.3. beschriebenen Methode hergestellt. Die Inkubation der Liposomen in Natriumascorbat-Lösung bzw. Phosphatpuffer erfolgte bei 37 °C. Die Reduktionskonstanten ($k_{\text{Reduktion}}$) bzw. Freisetzungskonstanten ($k_{\text{Freisetzung}}$) wurden aus der logarithmi-

schen Darstellung der Signalintensität bzw. des verkapselten Anteils in Abhängigkeit von der Zeit bestimmt.

Die Zugabe von Natriumascorbat-Lösung zu den Liposomenformulierungen führt zur Reduktion von CAT-1. Durch die sinkende Radikalkonzentration im Inneren der Liposomen und die dadurch verminderten Spin-Austauschwechselwirkungen erfolgte im Verlauf der Untersuchung ein Übergang des ESR-Signals von einem Singulett in ein Triplett (Abb. 48). Dessen Signalintensität wurde zunehmend vermindert, bis nach 168 h nur noch etwa ein Prozent der ursprünglich enthaltenen Spinsonde in der Formulierung verblieben war.

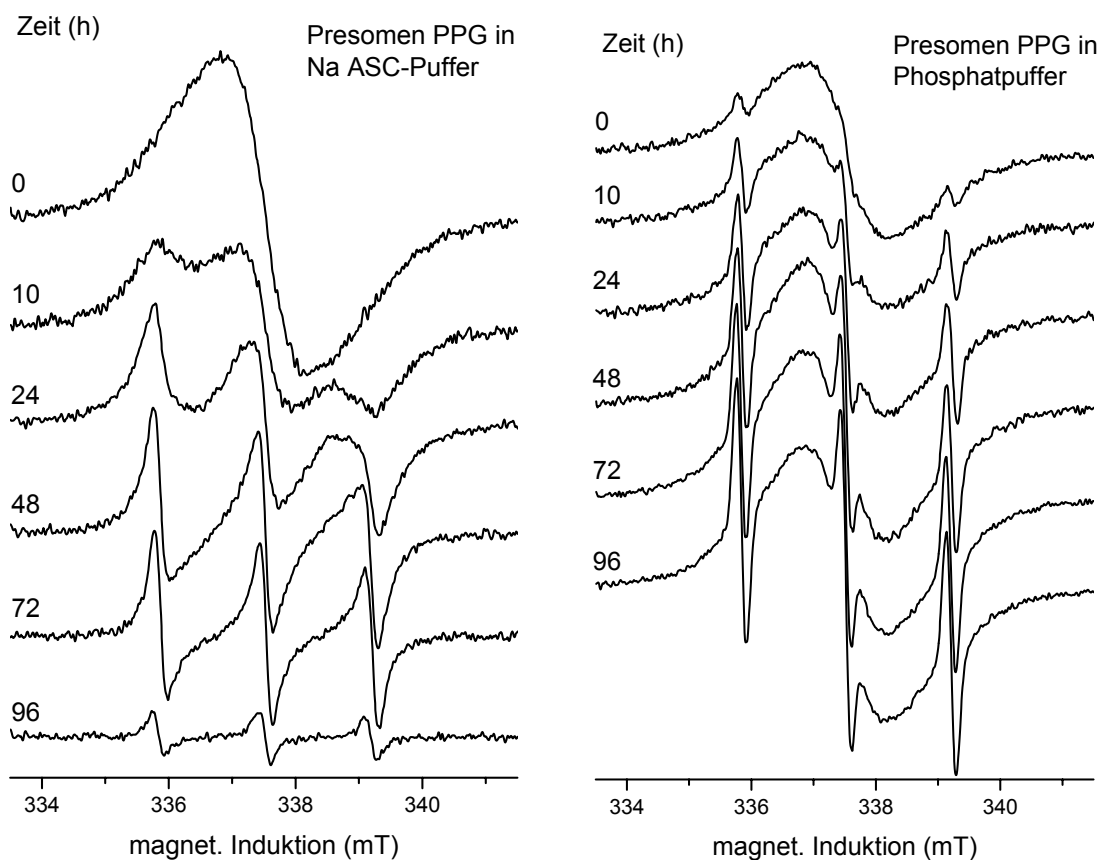


Abb. 48 X-Band ESR-Spektren von CAT-1 verkapselt in Presomen[®] PPG-I-Liposomen in Abhängigkeit von der Zeit nach Zugabe von Natriumascorbat-Puffer bzw. Phosphatpuffer

Durch die Freisetzung und anschließende Reduktion der Spinsonde durch Natriumascorbat bildet sich innerhalb der multilamellaren Liposomen ein Konzentrationsgradient zwischen den inneren und äußeren Schichten aus. Dieser kann durch die Auswertung der nach 10 bzw. 24 h aufgezeichneten ESR-Spektren belegt werden. Danach besteht das registrierte Gesamtspekt-

rum aus einer Überlagerung von drei Einzelspektren, und zwar einem Singulett und jeweils einem Triplett mit sehr breiten bzw. schmalen Einzellinien (Abb. 49). Während das Singulett Bereichen mit hohen Spinsondenkonzentrationen zugeordnet werden kann, belegt das Triplett mit sehr schmalen Einzellinien die Existenz von Bereichen mit sehr geringen CAT-1-Konzentrationen innerhalb der Liposomen. Die dritte Einzelkomponente kann einem intermediären Konzentrationsbereich zugeordnet werden. Aus dem Ergebnis wird deutlich, dass CAT-1 durch die Lipiddoppelmembran permeiert und nicht durch den Zerfall der Vesikel aus Liposomen freigesetzt wird. Im letzteren Fall wäre ein ESR-Signal in Form eines Singulett registriert worden, das aus dem verbleibenden verkapselten Anteil der hochkonzentrierten CAT-1 Lösung resultiert wäre.

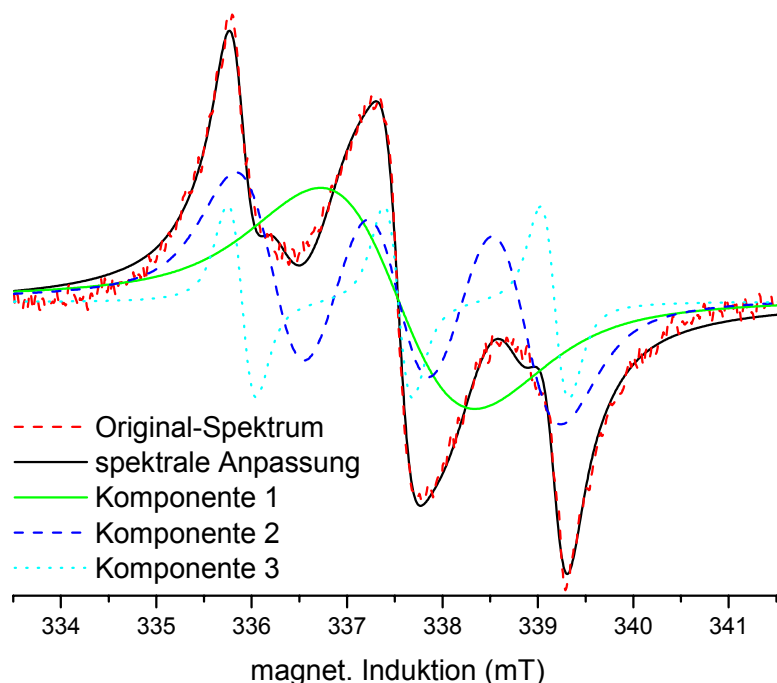


Abb. 49 ESR-Spektrum von CAT-1 verkapselt in Presomen® PPG-I-Liposomen und die mit dem Programm ISOTROP erstellte Anpassung mit deren Einzelkomponenten

Die in Abb. 48 dargestellten ESR-Spektren von CAT-1 in Liposomen aus Presomen® PPG-I, die in Phosphatpuffer inkubiert wurden, belegen die gute Differenzierbarkeit von verkapselten (Singulett) und freigesetzten Anteilen (Triplett) der Spinsonde. Im Verlauf der Untersuchung nimmt die Amplitude des Signaltripletts, das der freigesetzten Spinsonde zugeordnet wird, stark zu. Im Gegensatz zu den ESR-Spektren von liposomal eingeschlossenem CAT-1, das in Natriumascorbat-Lösung inkubiert wurde, blieb die ursprüngliche Spektrenform jedoch weit-

gehend erhalten. Die Auswertung der Freisetzungs- bzw. Reduktionskonstanten zeigt, dass die Freisetzung von CAT-1 aus Liposomen in Phosphatpuffer im Vergleich zu solchen in Natriumascorbat-Lösung stark verzögert erfolgt (Abb. 50). Dadurch wird ein starker Einfluss von Natriumascorbat auf die Freisetzung von CAT-1 belegt.

Die verstärkte Freisetzung in Anwesenheit von Natriumascorbat kann auf die Erhöhung des Konzentrationsgradienten durch die Reduktion von CAT-1 an der Liposomenoberfläche und die Entfernung der Radikale aus dem Diffusionsgleichgewicht zurückgeführt werden. Im Gegensatz dazu verbleiben Spinsonden, die aus Liposomen in Phosphatpuffer freigesetzt wurden, aufgrund der negativen Ladungsträger in den Lipidmembranen nahe der Oberfläche und vermindern den Konzentrationsgradienten.

Die durchgeführten Untersuchungen zeigen, dass CAT-1 aus Liposomen in Phosphatpuffer nur sehr langsam freigesetzt wird. Da Natriumascorbat die Freisetzung beschleunigt, kann davon ausgegangen werden, dass auch die Stabilität von Liposomen auf dem Stratum corneum, die unter 3.2.1. untersucht wurde, durch die Anwesenheit von Natriumascorbat vermindert wurde. Nachfolgend sollte daher der hier verwendete Versuchsansatz zur Untersuchung der Stabilität von Liposomen nach epikutaner Applikation herangezogen werden.

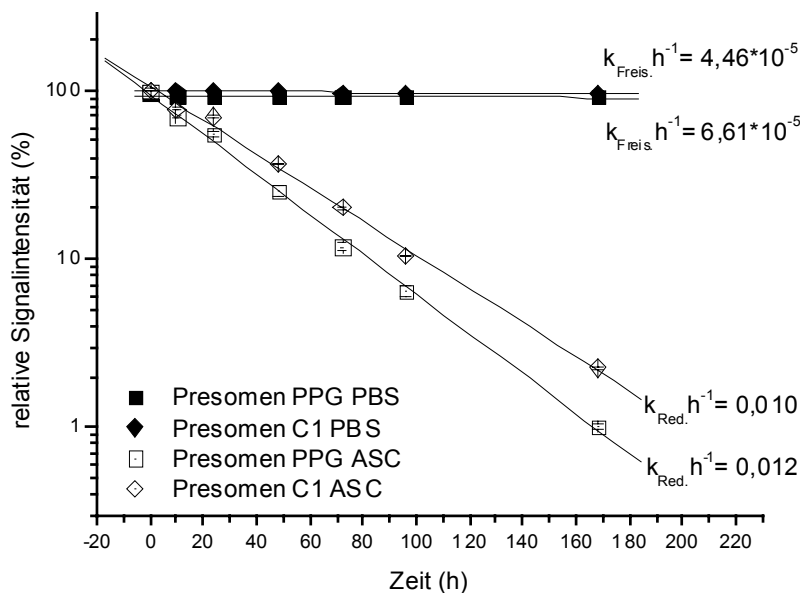


Abb. 50 Abhängigkeit der relativen Signalintensität von CAT-1 verkapselt in Presomen® C1- bzw. Presomen® PPG-I-Liposomen von der Zeit nach Zugabe von Natriumascorbat-Lösung bzw. Phosphat-Puffer ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

3.2.2.2 Nicht okklusive Applikation

Modelluntersuchungen mit Liposomen aus Presomen® PPG-I, Presomen® C1 bzw. Lösungen

Mit Hilfe der durchgeführten Modelluntersuchungen sollte ermittelt werden welchen spektralen Veränderungen die CAT-1 ESR-Signale nach der Applikation der Spinsonde in Liposomen unter nicht okklusiven Bedingungen auf dem unter 3.2.2 beschriebenen Modell unterliegen, d.h. wenn keine Penetrationsbarriere vorhanden ist und ein wässriges Akzeptormedium zur Verfügung steht. CAT-1-Lösungen dienten dabei als Referenz.

Nach der Applikation von Liposomen auf das Hautmodell wurde ein breites ESR-Signal registriert, das von einem Drei-Linien-Signal geringer Intensität überlagert ist (Abb. 51). Das breite Singulett geht auf CAT-1 in Lösungen mit hohen Spinsonden-Konzentrationen zurück, wie sie zur Hydratisierung der Lipidgrundlagen verwendet wurden und im Inneren von intakten Liposomen vorliegen. Das Triplett hingegen entsteht mit zunehmender Verdünnung der CAT-1-Lösung und belegt die Freisetzung der Spinsonde aus den Liposomen. Diese beginnt unmittelbar nach der Applikation der Zubereitung auf den Polycarbonatfilter, wie der Vergleich der Signalintensitäten des Triplets in der Formulierung vor und nach deren Applikation zeigt (Abb. 48, rechts bzw. 51, links; jeweils 0 h).

Im Verlauf der Untersuchung nahm der Anteil der nicht verkapselten Spinsonde kontinuierlich zu, bis nach 240 min ein Maximum von ca. 19 % erreicht wurde (Abb. 52). Die Auswertung der ESR-Spektren mit ISOTROP zeigt, dass die über 300 min aufgezeichneten Spektren aus zwei Einzelkomponenten, und zwar einem Singulett und einem Triplett, bestehen. Unter 3.2.2.1. wurde festgestellt, dass bei diffusionskontrollierter Freisetzung der Spinsonde aus Liposomen und abnehmender Konzentration der Spinsonde in den Vesikeln der Übergang des zugehörigen ESR-Signals von einem Singulett über ein Triplett mit breiten Linien, hin zu einem Triplett mit schmalen Linien erfolgt. Da dieser Übergang nicht festgestellt werden konnte, kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass die Freisetzung der Spinsonde, nach der Applikation der Liposomen auf den Membranfilter nicht diffusionskontrolliert, sondern durch den Zerfall der Vesikel auf der Oberfläche des Filters erfolgt.

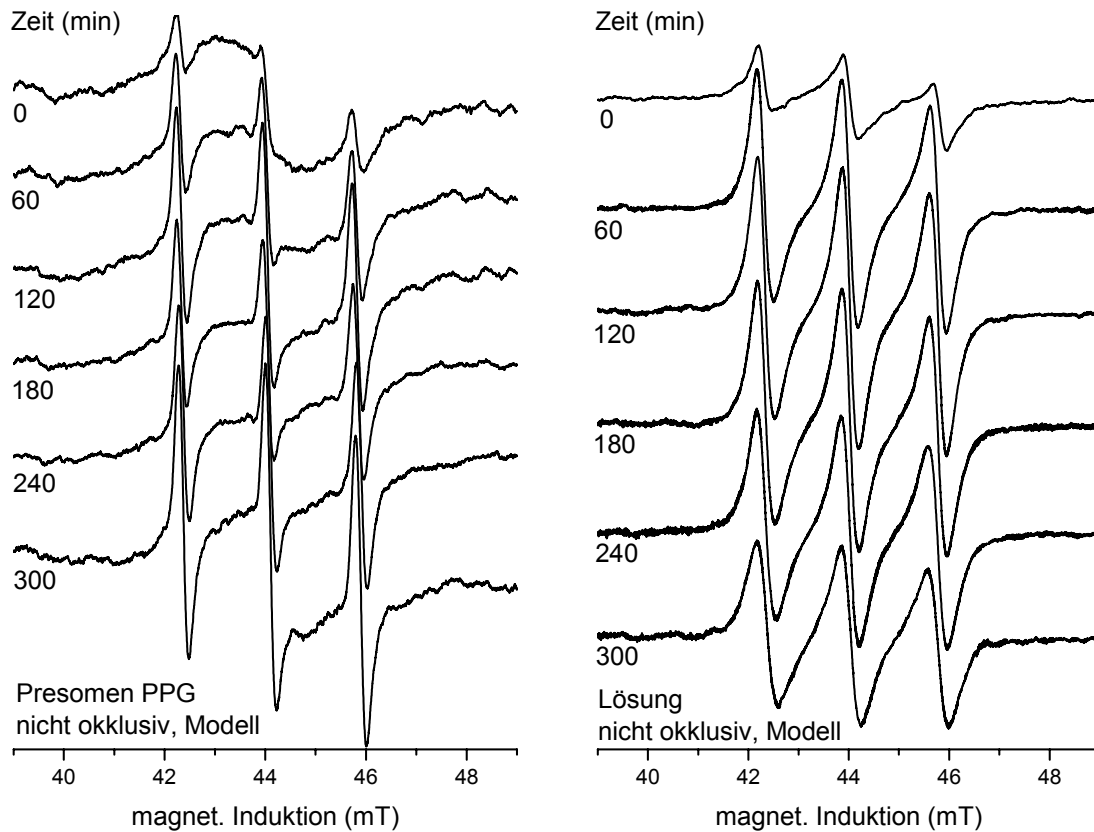


Abb. 51 L-Band ESR-Spektren der Spinsonde CAT-1 verkapselt in Presomen® PPG-I-Liposomen bzw. in Lösung in Abhängigkeit von der Zeit nach Applikation auf das Modell

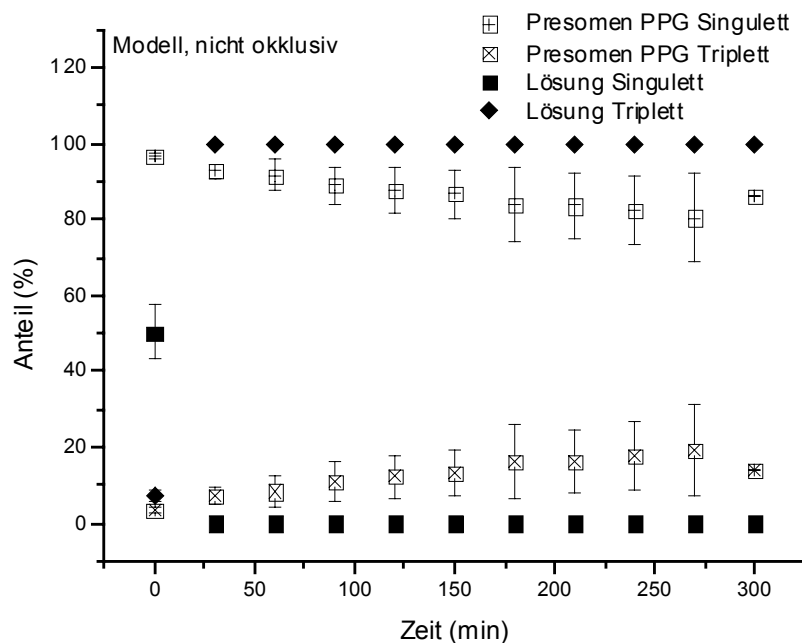


Abb. 52 Integrale Anteile der Singulett- bzw. Triplett-Komponente am Gesamtspektrum von CAT-1 in Abhängigkeit von der Zeit nach Applikation der Liposomenformulierung bzw. der Lösung auf das Modell ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Die Linienbreiten der Singulett- und Triplett-Komponente (Abb. 53) des Gesamtspektrums blieben während der gesamten Untersuchung nahezu konstant. Dadurch können registrierbare Veränderungen der Konzentration von CAT-1 in der Zubereitung auf der Oberfläche des Modells ausgeschlossen werden.

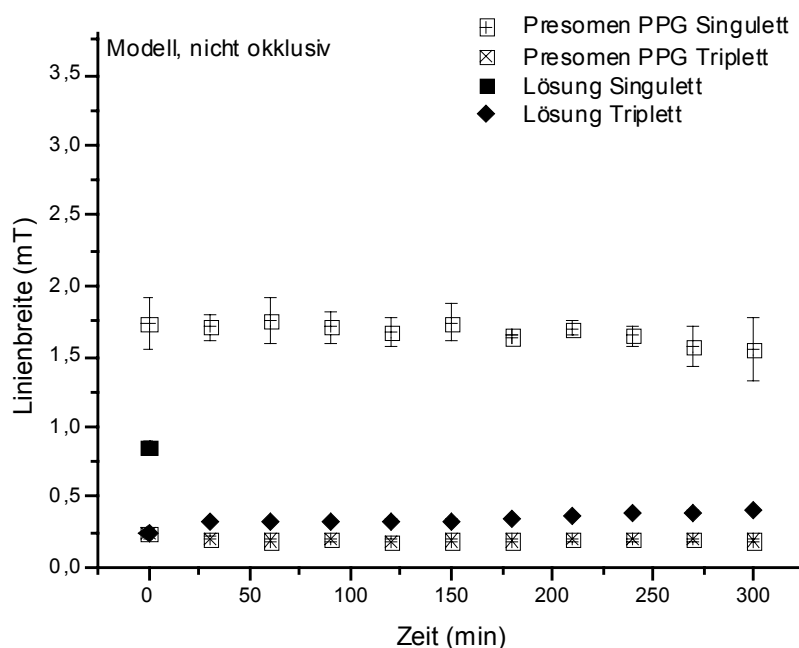


Abb. 53 Linienbreiten der Singulett- bzw. Triplett-Komponente von CAT-1 in Abhängigkeit von der Zeit nach Applikation der Liposomenformulierung bzw. der Lösung auf das Modell ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Als Referenz zu den untersuchten Liposomen wurde eine CAT-1-Lösung (138 mM) auf das Modell appliziert. Da der Polycarbonatfilter für diese kein Penetrationshindernis darstellt, trat nach der Applikation eine sofortige Verdünnung der Lösung ein. Das nach einer Minute aufgezeichnete ESR-Spektrum wird daher von einem Drei-Linien-Signal dominiert (Abb. 51). Die Auswertung dieses Spektrums mit ISOTROP ergab drei Einzelkomponenten, anhand derer drei Konzentrationsabstufungen unterschieden werden können. Erstens die ursprünglich sehr hoch konzentrierte Lösung (138 mM), deren Spektrum ein breites Singulett darstellt, zweitens ein Bereich, in dem eine geringe Spinsondenkonzentration vorlag, mit einem Drei-Linien-ESR-Signal von geringer Linienbreite (0,25 mT, Abb. 53), und drittens ein Bereich mit einer mittleren Konzentration und einem Drei-Linien-ESR-Signal mit breiten Einzellinien (0,71 mT). Die Auswertung der Flächenanteile dieser Einzelkomponenten des Spektrums ergaben 50,3 % für die Singulettkomponente (Abb. 52), 7,3 % für das Drei-Linien-Signal mit

geringer Linienbreite und 41,9 % für die dritte Komponente. Die nachfolgend aufgezeichneten Spektren bestanden aus einem Drei-Linien-Signal mit nur einer Komponente und Linienbreiten von etwa 0,33 bis 0,41 mT. Im Gegensatz zu Liposomen, in denen nach 240 min noch ca. 80 % der Spinsonde verkapselt auf der Oberfläche des Filters vorlagen, kommt es nach der Applikation von Lösungen zu einer schnellen Verteilung der Spinsonden im Modell.

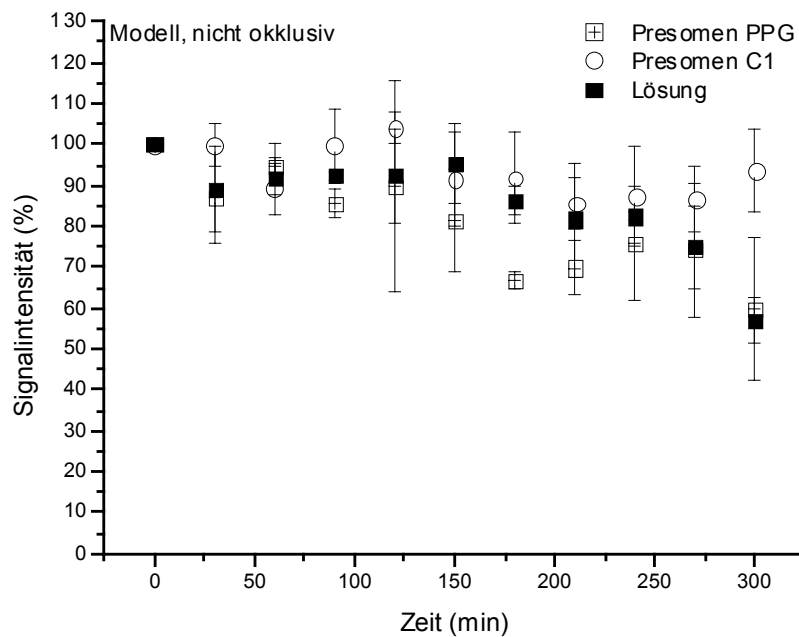


Abb. 54 Signalintensitäten der Spinsonde CAT-1 in Abhängigkeit von der Zeit nach Applikation von Liposomenformulierungen mit Presomen® PPG-I- bzw. Presomen® C1-Liposomen bzw. einer Lösung auf das Modell ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Die Signalintensität von CAT-1 in Presomen® PPG-I-Liposomen bzw. Lösungen nahm im Verlauf der Untersuchung ab, wohingegen die Signalintensität von CAT-1 in Presomen® C1-Liposomen um einen Mittelwert schwankte (Abb. 54). Die Abnahme der Signalintensitäten könnte auf eine Reduktion der Spinsonden durch Bestandteile des Agarosegels zurückzuführen sein, die jedoch nicht weiter untersucht wurde.

Die durchgeführten Untersuchungen haben gezeigt, dass die Freisetzung von CAT-1 aus multilamellaren Liposomen nach deren Applikation mit Hilfe des neu entwickelten Versuchsansatzes kontinuierlich anhand der spektralen Veränderungen des CAT-1 ESR-Spektrums verfolgt werden kann. Darüber hinaus konnte festgestellt werden, dass CAT-1 durch einen Verlust der Vesikelintegrität und nicht durch eine Permeation durch die Membranen der Vesikel auf der Oberfläche des Polycarbonatfilters freigesetzt wird. Ein Teil der Spinsonde

lag bis zum Ende der Untersuchung nach 300 min in intakten Liposomen verkapselt vor, was für den Depoteffekt von Liposomen von Bedeutung sein könnte.

Epikutane Applikation von Presomen® PPG-I, Presomen® C1 und Lösungen auf exzidierte Maushaut

Nachdem gezeigt wurde, dass die Freisetzung von CAT-1 aus Liposomen kontinuierlich verfolgt werden kann, sollte an exzidierter Maushaut überprüft werden, wie lange intakte Liposomen nach ihrer epikutanen Applikation als Depotsystem auf der Haut zur Verfügung stehen. Darüber hinaus sollten durch einen Vergleich der Liposomenzubereitungen mit Lösungen Informationen zur Bedeutung der Phospholipide für den Wasserverlust aus den applizierten Zubereitungen gewonnen werden.

Nach der epikutanen Applikation von CAT-1 in Presomen® PPG-I-Liposomen auf exzidierte Maushaut wurde ein ESR-Spektrum aufgezeichnet, das ebenso wie nach der Applikation der Zubereitung auf das Modell aus einem breiten Singulett und einem überlagerten Triplett besteht (Abb. 55). Die Triplett-Komponente hat einen größeren Anteil am Gesamtspektrum als in der ursprünglichen Formulierung, woraus auf die Freisetzung von CAT-1 aus den Vesikeln unmittelbar nach deren Applikation geschlossen werden kann. Durch die spektrale Information, d. h. das Vorliegen eines Singuletts neben einem Triplett konnte die Stabilität für einen Teil der epikutan applizierten multilamellaren Liposomen über 300 min belegt werden.

Im Gegensatz zum Modell nahm die Amplitude der Triplett-Komponente zunächst zu, dann jedoch wieder ab. Die Auswertung der Anteile der Singulett- bzw. Triplett-Komponente am Gesamtspektrum belegt jedoch eine kontinuierliche Zunahme des Triplett-Anteils auf 16 % im Verlauf der Untersuchung (Abb. 56). Die Abnahme der Signalamplitude ist auf die zunehmende Linienbreite des Triplett-Signals in der Folge von steigenden CAT-1 Konzentrationen in der äußeren Phase der Liposomen, und die damit verbundene Zunahme von Dipol-Dipol-Wechselwirkungen zurückzuführen (Abb. 57). Die Konzentrationszunahme wird dabei durch die kontinuierliche Freisetzung der Spinsonde und den steigenden Wasserverlust aus der Zubereitung bedingt. Summarisch resultiert der Wasserverlust aus dem Wasserverlust der äußeren und auch der inneren Phase der Liposomen. Dies wird durch die Auswertung der

Linienbreiten der Singulett-Komponente deutlich. Die Linienbreite nimmt von 1,735 mT bis auf 1,266 mT kontinuierlich ab, bis nach 150 min ein Plateau erreicht wird. Ein Vergleich mit den Linienbreiten in Tab. 7, die aus den Spektren der Konzentrationsreihe bestimmt wurden, zeigt, dass die Linienbreite im Fall des Singulett mit steigender Konzentration sinkt, wodurch der Wasserverlust aus dem Inneren der Liposomen nachgewiesen wird.

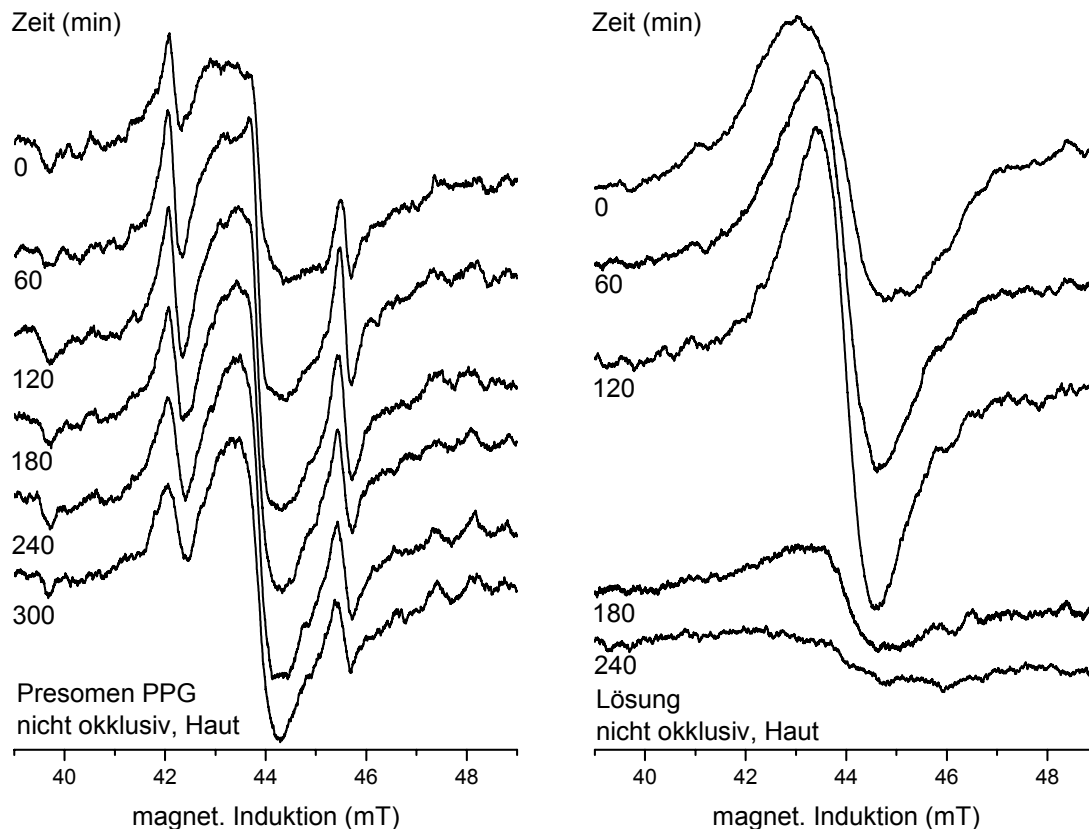


Abb. 55 L-Band ESR-Spektren der Spinsonde CAT-1 verkapselt in Presomen® PPG-I-Liposomen bzw. in Lösung in Abhängigkeit von der Zeit nach Applikation auf exzidierte Maushaut

Die ESR-Spektren, die nach der epikutanen Applikation von CAT-1-Lösungen aufgezeichnet wurden, zeigen ein Singulett, dessen Linienbreite im Verlauf der Untersuchung zunächst von 1,85 mT auf 1,27 mT abnahm (Abb. 55 und 56). Nach 150 min erfolgte ein Anstieg auf 3,25 mT. Die Abnahme der Linienbreite ist, ebenso wie nach der epikutanen Applikation von Liposomen, auf den Wasserverlust aus der Zubereitung und die dadurch ansteigende Spinsonden-Konzentration in der Lösung zurückzuführen. Im Gegensatz zu der Liposomenformulierung erreichte die Linienbreite jedoch kein Plateau, das auf einen konstanten Wassergehalt der

Formulierung im weiteren Verlauf der Untersuchung hindeutet, sondern stieg stark an.

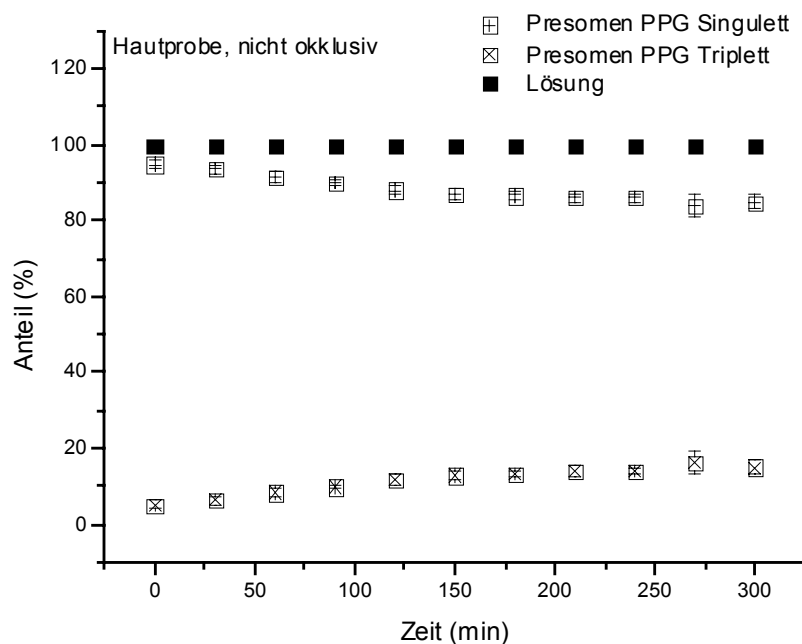


Abb. 56 Integrale Anteile der Singulett- bzw. Triplett-Komponente am Gesamtspektrum von CAT-1 in Abhängigkeit von der Zeit nach Applikation der Liposomenformulierung bzw. der Lösung auf exzidierte Maushaut ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

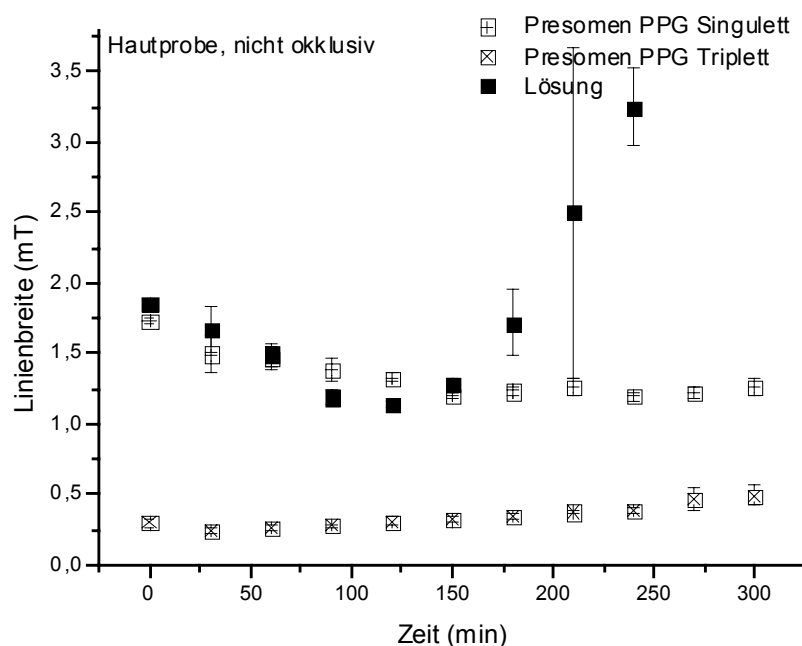


Abb. 57 Linienbreiten der Singulett- bzw. Triplett-Komponente von CAT-1 in Abhängigkeit von der Zeit nach Applikation der Liposomenformulierung bzw. der Lösung auf exzidierte Maushaut ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Der Anstieg der Linienbreite ist auf die Kristallisation der Spinsonde mit fortschreitendem

Wasserverlust aus der epikutan applizierten Lösung zurückzuführen. Die Ergebnisse zeigen, dass Liposomen im Gegensatz zu Lösungen eine wasserbindende Wirkung auf der Haut haben, die bereits von anderen Autoren als Verringerung des Transepidermalen Wasserverlusts (TEWL) beschrieben wurde [vgl. 268].

Die Penetration von CAT-1 in die Haut sollte, wie am Modell beobachtet, aufgrund der verminderten Spin-Spin-Wechselwirkungen den teilweisen Übergang des Signal-Singulett in ein Triplett nach sich ziehen. Da dieser Übergang fehlt, kann von der Reduktion der Spinsonde zu diamagnetischen Verbindungen in der Haut, insbesondere dem korrespondierenden Hydroxylamin, ausgegangen werden [111, 269, 270].

Die Reduktion von CAT-1 in der Haut und damit die Penetration der Spinsonde aus Liposomen und Lösungen sollte durch die Auswertung der ESR-Signalintensitäten abgeschätzt werden (Abb. 58). Während die Signalintensität von CAT-1 nach der Applikation von Presomen[®] PPG-I-Liposomen nur geringfügig abnahm, verringerte sich die Signalintensität von CAT-1 in Presomen[®] C1-Liposomen bis auf 64 % der Intensität des Ausgangsspektrums. Unter der Voraussetzung, dass intakte Liposomen nicht in die Haut penetrieren können, entspricht der reduzierte Anteil dem penetrierten Anteil der applizierten Spinsonde. Liposomen aus der Lipidgrundlage Presomen[®] C1 führen daher scheinbar zu einer stärkeren Penetration von CAT-1 als Liposomen aus der Lipidgrundlage Presomen[®] PPG-I.

Dass quantitative Aussagen in diesem Versuchsansatz nur sehr bedingt möglich sind, belegt die Auswertung der Signalintensitäten von CAT-1 in Lösungen. Diese blieb über 120 min nahezu konstant und fiel danach rapide auf 30 % des Ausgangswerts ab. Das Ergebnis legt die Vermutung nahe, dass in dem Zeitraum von 120 bis 240 min fast 70 % der applizierten Spinsonde in die Haut penetriert und dort reduziert worden sind. Die Einbeziehung der Linienbreiten in die Betrachtung zeigt, dass dieser Zeitraum mit der Kristallisation der Spinsonde auf der Haut zusammenfällt. Es ist daher anzunehmen, dass die kristallinen Anteile der Spinsonde aufgrund der hohen Linienbreite dieser Komponente bei der quantitativen Auswertung nur teilweise miterfasst werden. Quantitative Aussagen zur Reduktion der Spinsonden sind daher nur dann möglich, wenn die Kristallisation der Spinsonden auf der Haut, etwa durch okklusive Bedingungen, verhindert wird.

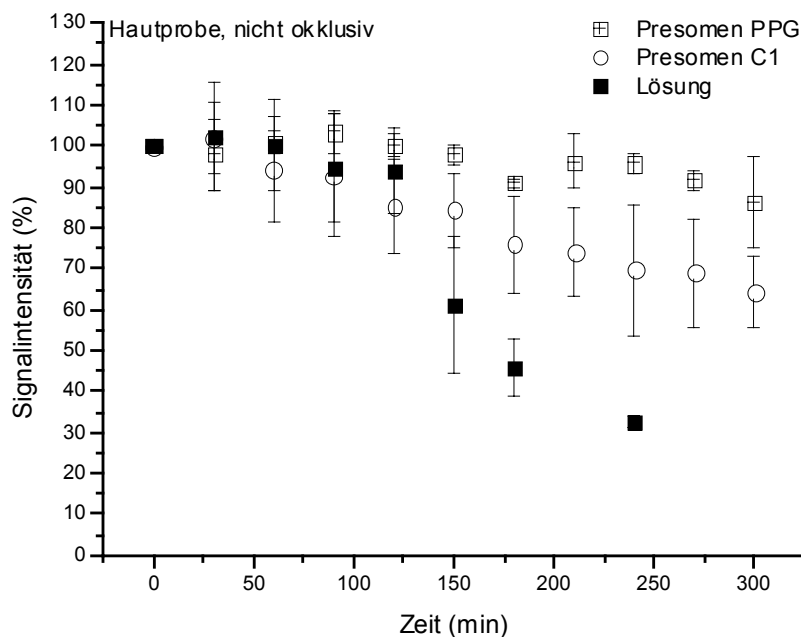


Abb. 58 Signalintensitäten der Spinsonde CAT-1 in Abhängigkeit von der Zeit nach epikutaner Applikation von Formulierungen mit Presomen® PPG-I- bzw. Presomen® C1-Liposomen bzw. einer Lösung auf exzidierte Maushaut ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Die durchgeführten Untersuchungen haben gezeigt, dass die epikutane Applikation zur Freisetzung von CAT-1 aus Liposomen führt, diese aber teilweise ihre Integrität über den Untersuchungszeitraum von 300 min beibehalten und auf der Haut als Depotsystem zur Verfügung stehen. Anhand der spektralen Veränderungen der CAT-1-Signale kann auf einen Wasserverlust aus der applizierten Zubereitung geschlossen werden, der zu einer Konzentrationszunahme der Spinsonde in der inneren und äußeren Phase der Liposomen führt. Während die applizierten Phospholipide diesen Wasserverlust verzögern, kristallisiert die Spinsonde nach der epikutane Applikation in Lösungen rasch aus.

Epikutane Applikation von Presomen® PPG-1, Presomen® C1 und Lösungen *in vivo*

Nachfolgend sollte überprüft werden, ob die anhand der Untersuchungen am Modell bzw. exzidiierter Maushaut gewonnenen Erkenntnisse zur Stabilität von applizierten Liposomen auf In-Vivo-Bedingungen übertragbar sind.

Die ESR-Spektren der nachfolgend durchgeführten *In-vivo*-Versuche weisen durchgängig

Rauschanteile auf, die auf den Herzschlag und die Atmung der Tiere sowie dielektrische Verluste zurückgehen.

DPPH, dessen Ein-Linien-Signal die aufgezeichneten Spektren im Bereich des Mittelpeaks der Triplet-Komponente überlagert, diente in den *In-vivo*-Untersuchungen als Standard und wurde an der Halterung, die zur Fixierung der Mäuse im Resonator diente, unterhalb der Injektionsstelle bzw. der Brust der Tiere befestigt. Das ESR-Signal des Standards ist in Abb. 59. mit einem Pfeil markiert.

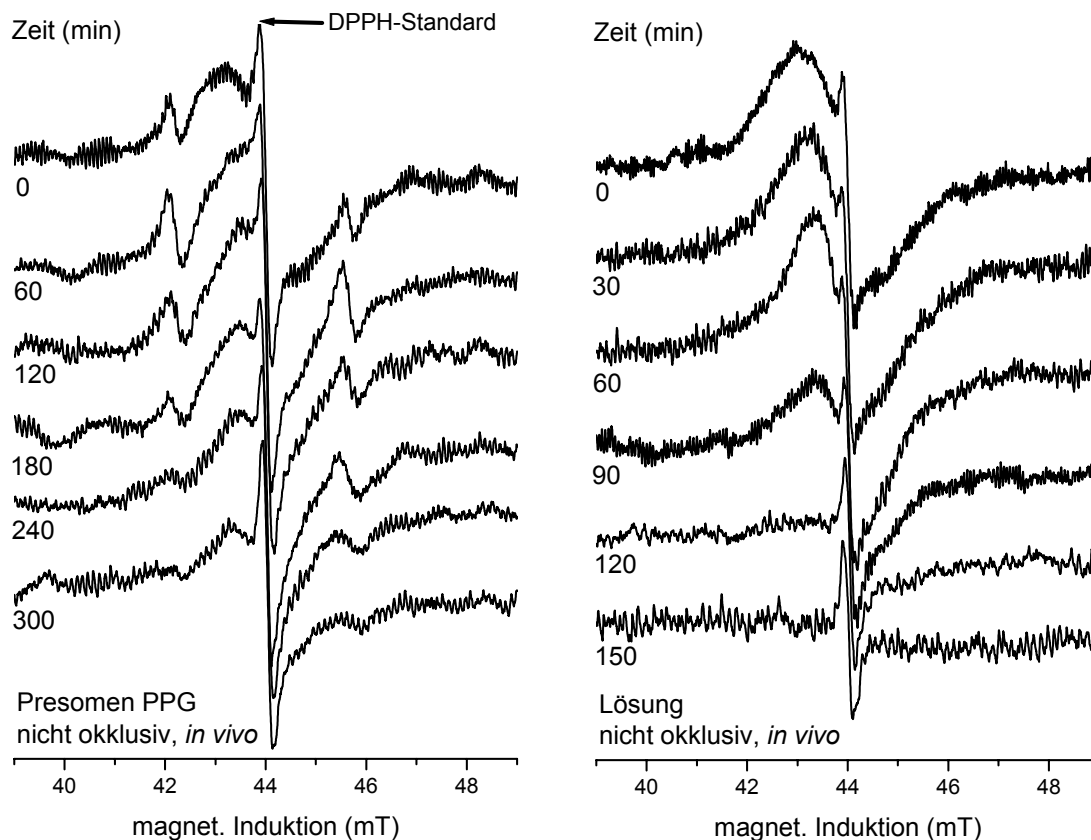


Abb. 59 *In-vivo* L-Band ESR-Spektren der Spinsonde CAT-1 (138 mM) verkapselt in Presomen® PPG-I-Liposomen bzw. in Lösung nach nicht okklusiver Applikation mit DPPH als Standard

In den *In-vivo*-Untersuchungen konnte die Freisetzung von CAT-1 aus Liposomen ebenso wie in den vorausgegangenen *In-vitro*-Untersuchungen durch die Überlagerung eines Singulett mit einem Triplet nachgewiesen werden (Abb. 59). Die Freisetzung erfolgte unmittelbar nach der Applikation der Zubereitung und nahm im Verlauf der Untersuchung bis auf maximal 8,6 % zu (Abb. 60). Damit fällt die nachweisbare Freisetzung geringer aus als in den entspre-

chenden *In-vitro*-Untersuchungen. Es ist jedoch zu berücksichtigen, dass die Auswertung durch das Rauschen und die Berechnung von drei statt zwei Komponenten aus den Gesamtspektren ungenauer ist als bei den *In-vitro*-Untersuchungen (vgl. Abb. 47 und 48). Der direkte Vergleich der Absolutwerte aus *In-vitro*- und *In-vivo*-Untersuchungen ist daher nur unter Vorbehalt möglich.

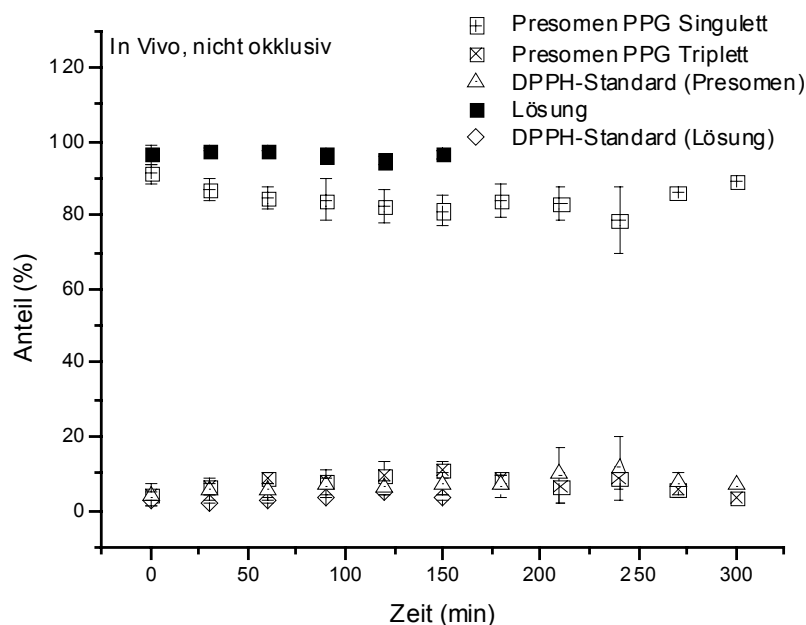


Abb. 60 Integrale Anteile der Singulett- bzw. Triplet-Komponente am Gesamtspektrum von CAT-1 in Abhängigkeit von der Zeit nach Applikation der Liposomenformulierung bzw. der Lösung auf Maushaut *in vivo* ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Der Vergleich der Linienbreiten der Triplet-Komponenten der *In-vivo*- und *In-vitro*-Untersuchungen zeigt, dass es *in vivo* zu einem schnelleren Anstieg der Linienbreite kommt (Abb. 61). *In vivo* stieg die Linienbreite innerhalb von 180 min auf ca. 0,5 mT an und nahm in den folgenden 60 min auf 0,53 mT zu, während sie *in vitro* erst nach 300 min einen Wert von 0,5 mT erreichte. Der Anstieg der Linienbreite geht auf den Wasserverlust und die dadurch ansteigende Konzentration von CAT-1 in der Zubereitung zurück, in deren Folge die Spinaustausch- und Dipol-Dipol-Wechselwirkungen der Spinsonden untereinander zunehmen. Als Ergebnis ist festzustellen, dass es bei dem *In-Vivo*-Experiment zu einem schnelleren und größeren Wasserverlust aus der applizierten Zubereitung kommt als dies unter den gewählten Bedingungen der *In-Vitro*-Experimente der Fall war. Dieses Ergebnis wird durch

die Auswertung der Linienbreiten der Singulett-Komponente unterstützt. Diese nahm innerhalb der ersten 100 min durch die steigenden Spinaustausch- und Dipol-Dipol-Wechselwirkungen mit steigender CAT-1-Konzentration kontinuierlich ab.

Die Spinsonden-Konzentration steigt damit *in vivo* schneller an als in den *In-vitro*-Untersuchungen, bei denen das Linienbreitenminimum dieser Komponente erst nach 150 min erreicht wurde. Im Gegensatz zu den *In-vitro*-Untersuchungen kam es nach 300 min zu einem sprunghaften Anstieg der Linienbreite von 1,25 mT auf 1,78 mT. Dieser Anstieg ist wahrscheinlich mit der partiellen Kristallisation von CAT-1 verbunden, wie sie nach der epikutanen Applikation von CAT-1-Lösungen in *In-vitro*-Untersuchungen beobachtet wurde. Anhand der spektralen Information kann abgeleitet werden, dass der größte Anteil der Spinsonde bis zur Kristallisation verkapselt in den Liposomen vorliegt und nicht in die Umgebung freigesetzt wird.

Nach der epikutanen Applikation der CAT-1-Lösung setzte *in vivo* ebenso wie *in vitro* ein Wasserverlust aus der Zubereitung ein, der bereits nach 60 min zur Kristallisation der Spinsonde auf der Haut führte (Abb. 59). Damit verbunden ist ein Anstieg der Linienbreite von 1,20 mT auf 3,82 mT (Abb. 60). In den *In-vivo*-Untersuchungen erfolgt der Wasserverlust aus den applizierten Lösungen schneller als unter den für die *In-vitro*-Untersuchungen gewählten Bedingungen. In den *In-Vitro*-Untersuchungen begann die Kristallisation der Spinsonde erst nach 150 min.

Die nach der Applikation von Lösungen aufgezeichneten ESR-Spektren weisen keinen Triplett-Anteil auf, der auf penetrierte Anteile der Spinsonde hinweisen würde.

Die Signalintensitäten der Spinsonde CAT-1, die in Presomen[®] C1 bzw. Presomen[®] PPG-I-Liposomen eingeschlossen war, nahm innerhalb von 300 min um ca. 50 % ab (Abb. 62). Gleichzeitig nahm der relative Anteil des DPPH-Standards von 3,8 % auf 11,4 % zu.

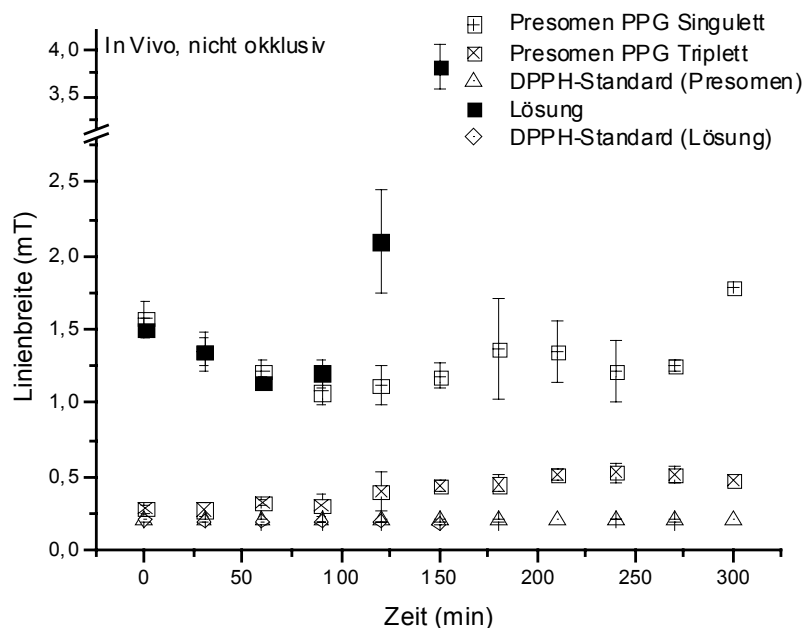


Abb. 61 Linienbreiten der Singulett- bzw. Triplet-Komponente von CAT-1 in Abhängigkeit von der Zeit nach Applikation der Liposomenformulierung bzw. der Lösung auf Maushaut *in vivo* ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Die Diskrepanz zwischen diesen Ergebnissen belegt die Schwierigkeiten, quantitative Aussagen anhand der Signalintensitäten bzw. dem Verhältnis zwischen dem ESR-Signal von CAT-1 und dem Signal des DPPH-Standard zu machen. Wie bereits unter dem vorhergehenden Punkt ausgeführt, verhindert die Kristallisation der Spinsonde auf der Haut auch bei den In-vivo-Untersuchungen wahrscheinlich die vollständige Erfassung des applizierten CAT-1, wodurch quantitative Aussagen nur sehr bedingt möglich sind.

Durch die *In-Vivo*-Untersuchungen wird die gewonnenen Erkenntnis bestätigt, dass Liposomen bzw. Phospholipide den Wasserverlust aus epikutan applizierten Formulierungen stark verzögern. Weiterhin konnte bestätigt werden, dass Liposomen zum größten Teil innerhalb der ersten Stunden nach der Applikation ihre Integrität beibehalten. In den *In-Vivo*-Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Spinsonde, die im Inneren der Liposomen vorliegt nach 270 min aufgrund des Wasserverlustes aus der Zubereitung kristallisiert und somit ein Spinsondendepot auf der Haut entsteht aus dem die Spinsonde nur langsam an die Haut abgegeben werden kann.

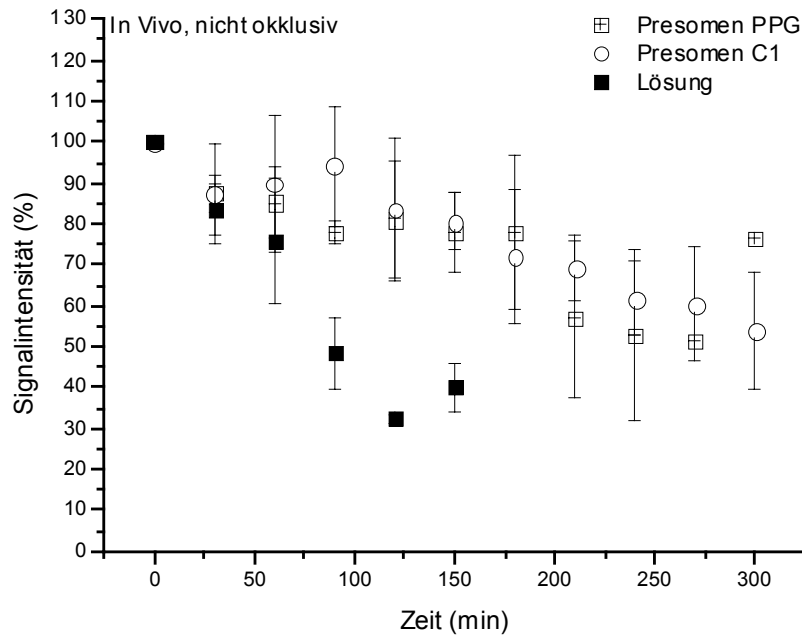


Abb. 62 Signalintensitäten der Spinsonde CAT-1 in Abhängigkeit von der Zeit nach Applikation von Formulierungen mit Presomen® PPG-I- bzw. Presomen® C1-Liposomen bzw. einer Lösung auf Maushaut *in vivo* ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

3.2.2.3 Okklusive Applikation

In den folgenden Untersuchungen sollte der Einfluss des Wasserverlusts aus der Zubereitung auf die Freigabe von CAT-1 aus Liposomen durch einen Vergleich von okklusiver und nicht okklusiver Applikation bestimmt werden. Die Okklusion behindert die normale Wasserabgabe der Haut, was im Stratum corneum einen Anstieg des Wassergehaltes bis zu 50 % zur Folge hat [vgl. 271]. Die Hydratisierung der Hornhaut führt nach Barry [272] zu einem Anstieg der Fluidität der intercorneocytären Bilayer und damit zu einer Verminderung des Widerstandes gegenüber penetrierenden lipophilen und hydrophilen Arzneistoffen. Cevc konnte im Gegensatz dazu für Transfersomen zeigen, dass die Penetration von Membranbestandteilen dieser Vesikel unter okklusiven Bedingungen deutlich vermindert wird [165]. Inwieweit der Enhancer-Effekt [273] der Okklusion die Penetration bzw. Reduktion der Spinsonde CAT-1 beeinflusst, sollte daher ebenfalls Gegenstand der nachfolgenden Untersuchungen sein.

Modelluntersuchungen mit Liposomen aus Presomen® PPG-I, Presomen® C1 bzw. Lösungen

Zunächst sollten Untersuchungen am Modell unter okklusiven Bedingungen durchgeführt werden, um Informationen über die Integrität von applizierten Liposomen unter Ausschluss der Wechselwirkungen mit der Haut zu erhalten.

Nach der okklusiven Applikation von CAT-1 in Liposomen auf das Hautmodell wurden ESR-Spektren aufgezeichnet, die aus der Überlagerung eines breiten Singulett und eines Triplett bestehen (Abb. 63). Im Verlauf der Untersuchung kam es zu einer raschen Zunahme der Signalamplitude des Drei-Linien-Signals. Die Auswertung der Spektren hinsichtlich der Intensitätsverteilung zwischen der Singulett- und Triplett-Komponente bzw. zwischen der verkapselten und freigesetzten Spinsonde zeigt, dass im Untersuchungszeitraum von 300 min der Anteil der freigesetzten Spinsonde auf 38 % anstieg (Abb. 64). Dagegen wurden unter nicht okklusiven Bedingungen nur 19 % der verkapselten Spinsonde freigesetzt.

Als Ergebnis ist festzuhalten, dass die Stabilität der Liposomen auf dem Modell unter okklusiven Bedingungen geringer ist, als unter nicht okklusiven Bedingungen. Das Ergebnis überrascht insofern, als dass eine erhöhte Stabilität der Liposomen durch die Beseitigung der Luft-Dispersions-Grenzfläche und des Wasserverlusts aus der Zubereitung erwartet worden war. Ein Kontrollexperiment, bei dem die Liposomenzubereitung auf die Baumwollauflage des Okklusionspflasters aufgetragen wurde, belegte die Stabilität der Liposomen über 300 min, weshalb Inkompatibilitäten zwischen der Baumwollauflage und der Zubereitung als Grund für die geringere Stabilität der Liposomen unter Okklusion ausgeschlossen werden können. Die Auswertung der Linienbreiten der Einzelkomponenten des Gesamtspektrums zeigt, dass sich sowohl die Linienbreite der Singulett-Komponente als auch die der Triplett-Komponente nur geringfügig ändern (Abb. 65). Eine Zunahme der Spinsondenkonzentration in der Formulierung auf dem Modell kann durch den unterbundenen Wasserverlust aus der Zubereitung erwartungsgemäß ausgeschlossen werden.

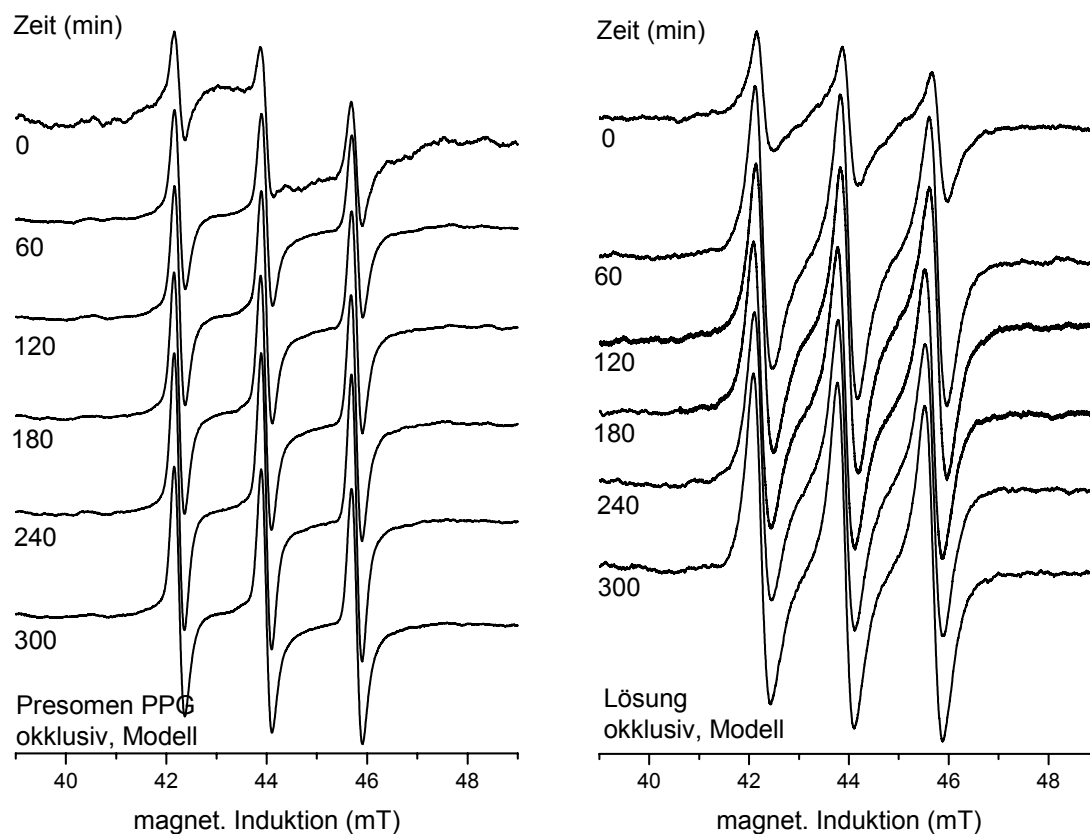


Abb. 63 L-Band ESR-Spektren der Spinsonde CAT-1 verkapselt in Presomen® PPG-I-Liposomen bzw. in Lösung in Abhängigkeit von der Zeit nach okklusiver Applikation auf das Modell

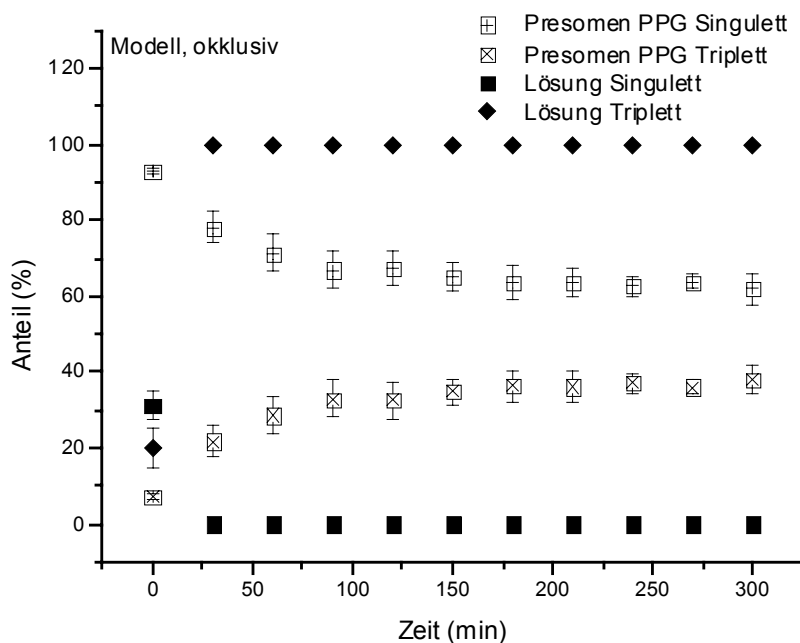


Abb. 64 Integrale Anteile der Singulett- bzw. Triplet-Komponente am Gesamtspektrum von CAT-1 in Abhängigkeit von der Zeit nach okklusiver Applikation der Liposomenformulierung bzw. der Lösung auf das Modell ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Nach der okklusiven Applikation von Lösungen wurde ein Spektrum aufgezeichnet, dass ebenso wie nach der nicht okklusiven Applikation aus drei Einzelkomponenten besteht, nämlich einem Triplett mit geringer bzw. hoher Linienbreite und einem Singulett (Abb. 64). Die Anteile der Einzelkomponenten des Spektrums betragen 19,9 % für das Triplett mit geringer Linienbreite, 48,9 % für das Triplett mit hoher Linienbreite bzw. 31,2 % für das Singulett (Abb. 64). Die nachfolgend aufgezeichneten Spektren bestehen zu 100 % aus einem Triplett mit geringer Linienbreite, wodurch die rasche Verteilung der Spinsonden im Modell belegt wird. Das Ergebnis zeigt, dass die Diffusion der Spinsonde in das Modell durch die Baumwollauflage des Okklusionspflasters nicht entscheidend behindert wird.

Die Linienbreiten der Einzelkomponenten der Spektren veränderten sich in Analogie zu der nicht okklusiven Applikation von Lösungen nicht (Abb. 65). Änderungen der Spinsondenkonzentration innerhalb des Modells, die zu einer Zunahmen der Linienbreite führen würden können, damit ausgeschlossen werden.

Die Signalintensität von CAT-1 in Presomen[®] PPG-I-Liposomen bzw. in Lösung blieb, von Schwankungen abgesehen, nahezu konstant (Abb. 66). Dagegen nahm die Signalintensität von CAT-1 in Presomen[®] C1-Liposomen mit zunehmender Dauer der Versuche ab.

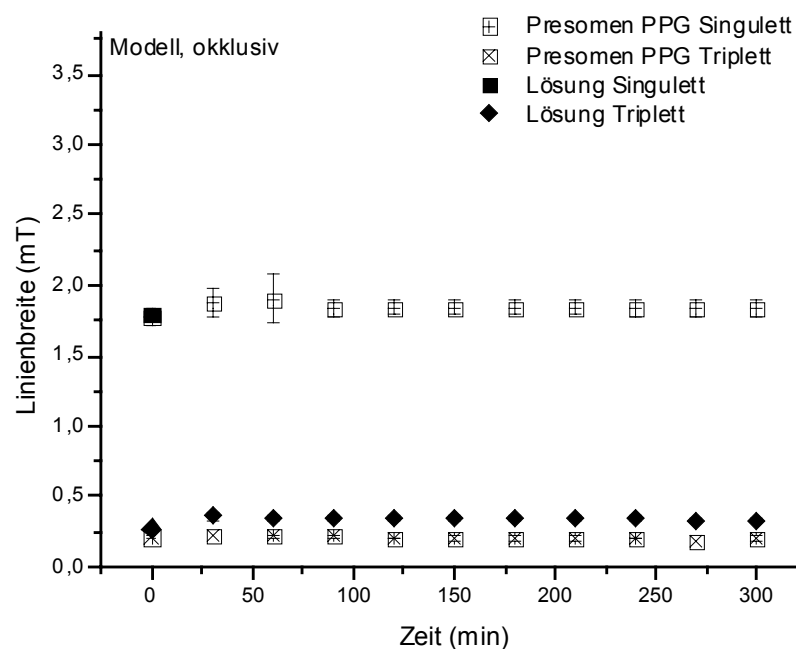


Abb. 65 Linienbreiten der Singulett- bzw. Triplett-Komponente von CAT-1 in Abhängigkeit von der Zeit nach okklusiver Applikation der Liposomenformulierung bzw. der Lösung auf das Modell ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

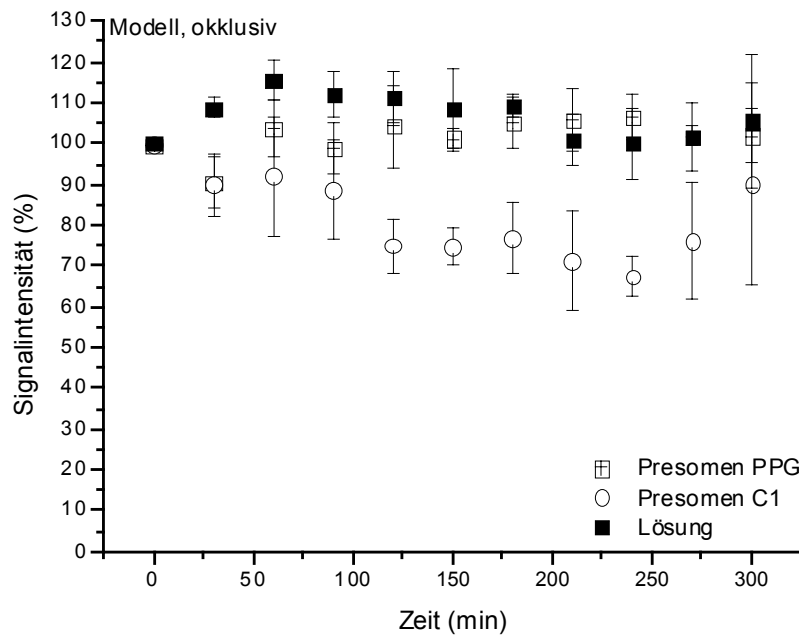


Abb. 66 Signalintensitäten der Spinsonde CAT-1 in Abhängigkeit von der Zeit nach okklusiver Applikation von Presomen[®] C1-, Presomen[®] PPG-I-Liposomen bzw. der Lösung auf das Modell ($\bar{x} \pm s$, n = 3)

Epikutane Applikation von Presomen[®] PPG-I, Presomen[®] C1 und Lösungen auf exzidierte Maushaut

Durch Untersuchungen an exzidierter Maushaut sollten Informationen über die Integrität von epikutan applizierten Liposomen unter okklusiven Bedingungen gewonnen werden. Darüber hinaus war von Interesse, ob die unter okklusiven Bedingungen ansteigende Hydratisierung der Hornhautbarriere zu einer erhöhten Penetration der Spinsonde CAT-1 führt.

Nach der okklusiven Applikation der Liposomenformulierungen auf exzidierte Maushaut wurde ebenso wie nach der nicht okklusiven Applikation ein ESR-Signal aufgezeichnet, das aus einem breiten Singulett und einem Triplett besteht (Abb. 67). Die Auswertung der Anteile der Einzelkomponenten am Gesamtspektrum zeigt, dass ca. 97 % der Spinsonde verkapselt in Liposomen vorlagen (Abb. 68). Dieser Anteil blieb im Verlauf der Untersuchung nahezu konstant. Es kann daher die Schlussfolgerung gezogen werden, dass bei einem konstanten Wasserpartialdruck in der Zubereitung keine Freisetzung der Spinsonde aus den Liposomen und keine Zunahme der Konzentration von CAT-1 in der Formulierung auftritt. Letzteres wird

durch die Auswertung der Linienbreiten der Singulett- und Triplett-Komponente belegt, die im Verlauf der Untersuchung nahezu unverändert blieben (Abb. 69).

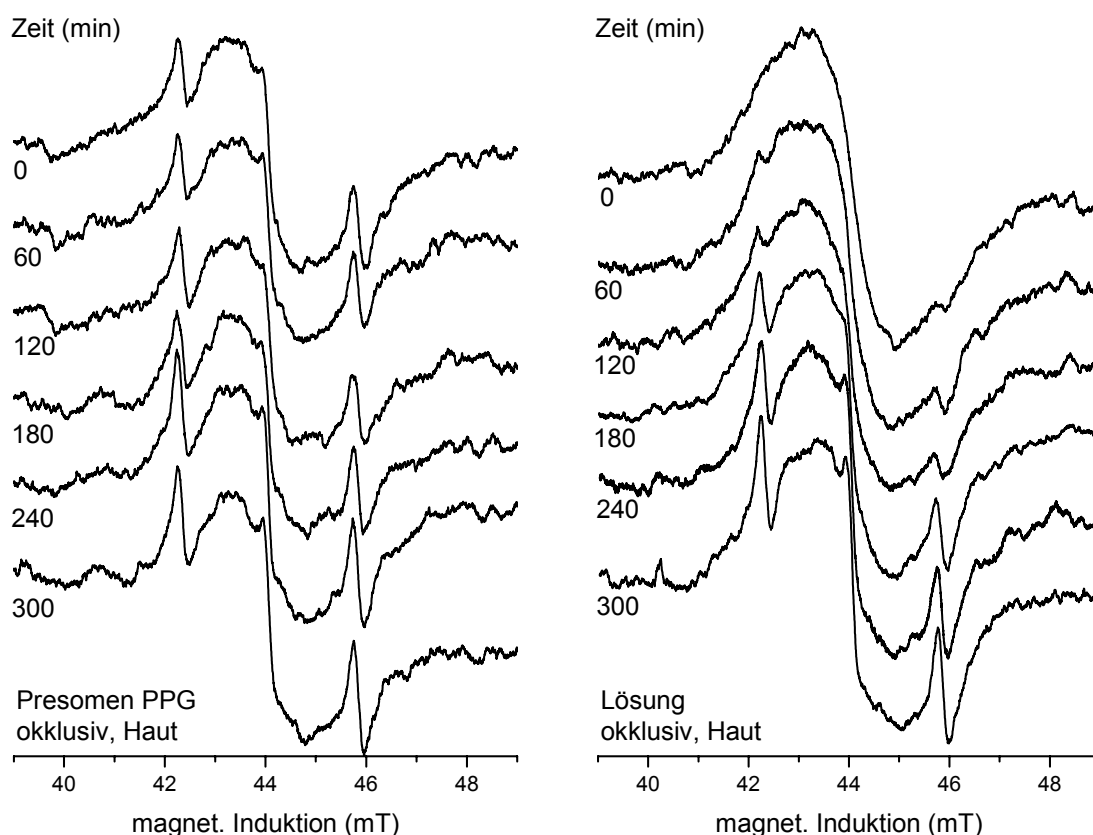


Abb. 67 L-Band ESR-Spektren der Spinsonde CAT-1 verkapselt in Presomen® PPG-I-Liposomen bzw. in Lösung in Abhängigkeit von der Zeit nach okklusiver Applikation auf exzidierte Maushaut

Nach der Applikation der Lösung auf die exzidierte Haut wurde zunächst ein ESR-Signal aufgezeichnet, das aus einem Singulett ohne weitere Komponenten besteht (Abb. 67). Im Verlauf der Untersuchung wurde dieses Singulett zunehmend von einem Triplett überlagert, dessen Anteil am Gesamtspektrum auf maximal 2,5 % anstieg (Abb. 68). Das Triplett geht auf den Anteil der Spinsonde zurück, der in die Haut penetriert ist, dort aber nicht reduziert wurde. Die mit der Penetration der Sonde verbundene Entstehung des Triplets wird, wie bei der Freisetzung aus dem Inneren von Liposomen, durch die Verminderung der Dipol-Dipol- und Spinaustauschwechselwirkungen hervorgerufen. Die Linienbreiten der beiden Komponenten blieben während der Untersuchung unverändert (Abb. 69). Aus dem Ergebnis kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass in der CAT-1-Lösung auf der Haut keine Konzentra-

tionsveränderungen eintraten. Ein Verlust von Wasser aus der Zubereitung kann damit ebenso ausgeschlossen werden wie eine Aufnahme von Wasser aus der Haut, die zu einer Zunahme der Linienbreite bzw. zu einem Übergang des Singulett in ein Triplet geführt hätte (vgl. Tab. 7).

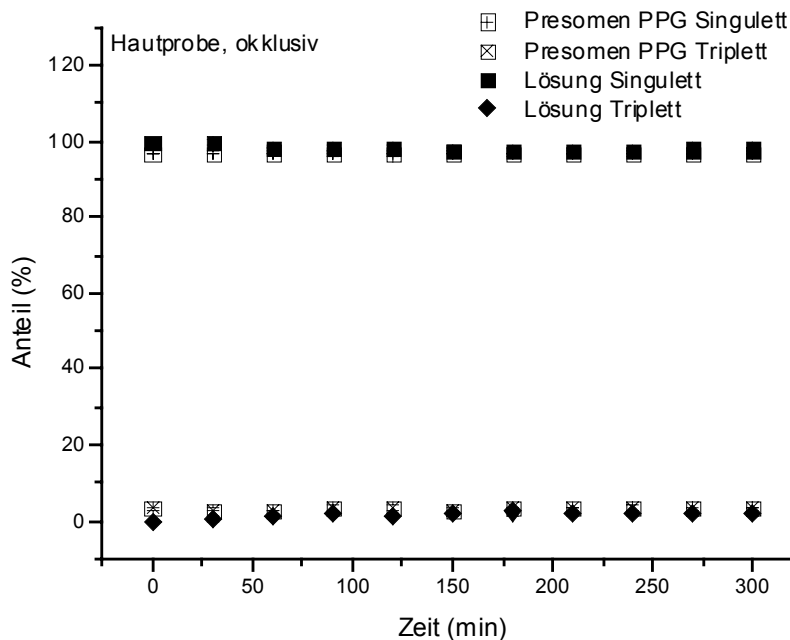


Abb. 68 Integrale Anteile der Singulett- bzw. Triplet-Komponente am Gesamtspektrum von CAT-1 in Abhängigkeit von der Zeit nach okklusiver Applikation der Liposomenformulierung bzw. der Lösung auf exzidierte Maushaut ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Nach der Applikation von CAT-1 in Liposomen bzw. in Lösung auf exzidierte Maushaut blieben die Signalintensitäten nahezu konstant (Abb. 70). Da die Penetration der Spinsonde anhand der Entwicklung der Signalform von CAT-1 nach der okklusiven Applikation von Lösungen eindeutig nachgewiesen werden konnte, und die Haut über eine umfangreiche enzymatische Ausstattung verfügt, die in der Lage ist, eindringende Radikale rasch zu reduzieren, überrascht dieses Ergebnis. Damit konnte die Penetration der Spinsonde zwar qualitativ nachgewiesen werden, unter den bestehenden experimentellen Bedingungen konnte die Reduktion der Spinsonde jedoch nicht quantifiziert werden.

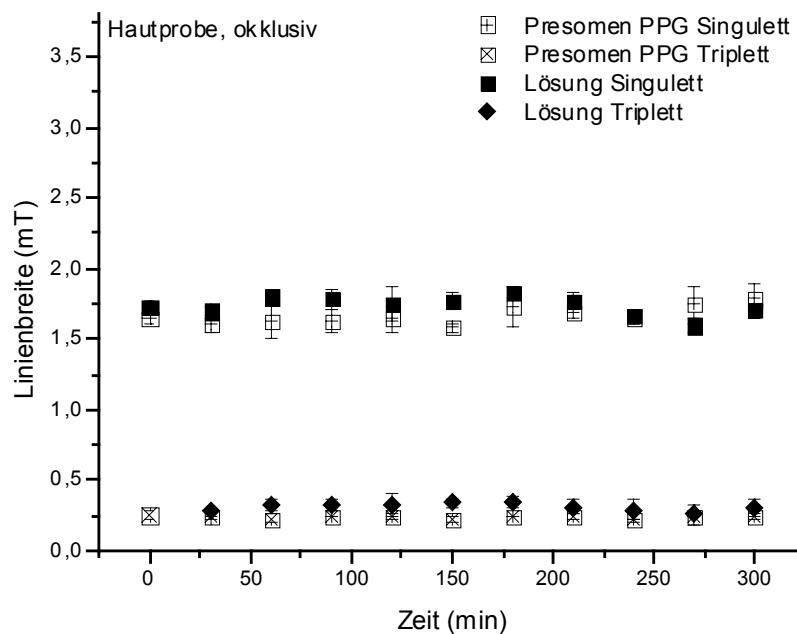


Abb. 69 Linienbreiten der Singulett- bzw. Triplet-Komponente von CAT-1 in Abhängigkeit von der Zeit nach okklusiver Applikation der Liposomenformulierung bzw. der Lösung auf exzidierte Maushaut ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

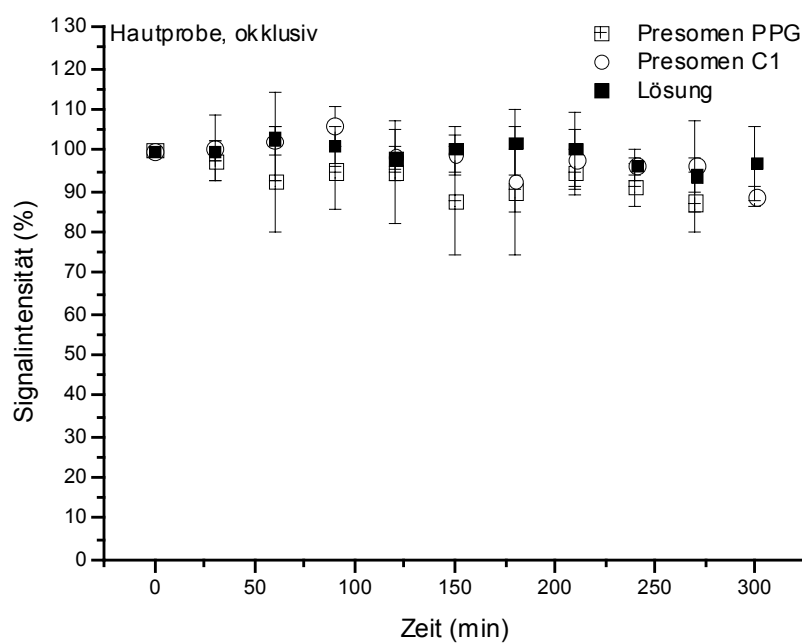


Abb. 70 Signalintensitäten der Spinsonde CAT-1 in Abhängigkeit von der Zeit nach okklusiver Applikation von Presomen® C1-, Presomen® PPG-I-Liposomen bzw. der Lösung auf exzidierte Maushaut ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Epikutane Applikation von Presomen® PPG-I, Presomen® C1 und Lösungen *in vivo*

Nachdem in In-Vitro-Untersuchungen unter okklusiven Bedingungen eine erhöhte Stabilität von epikutan applizierten Liposomen nachgewiesen werden konnte sollte überprüft werden, ob die erhöhte Stabilität auch unter In-Vivo-Bedingungen nachgewiesen werden kann. Weiterhin sollte überprüft werden, ob die Applikation von CAT-1 in Lösungen unter okklusiven Bedingungen in vivo ebenso zu einer verbesserten Penetration führt wie in vitro.

Nach der okklusiven, topischen Applikation von Liposomen *in vivo* wurden Spektren aufgezeichnet, die ebenso wie die Spektren der *In-vitro*-Untersuchungen aus der Überlagerung von drei Einzelkomponenten bestehen (Abb.71). Das Singulett mit der großen Linienbreite wird der verkapselten Spinsonde zugeordnet, das Triplett dagegen der freigesetzten Spinsonde, und das Singulett mit der geringen Linienbreite geht auf den mitgeführten DPPH-Standard zurück.

Im Gegensatz zur nicht okklusiven Applikation ändern sich die Anteile der Einzelkomponenten am Gesamtspektrum, ebenso wie die zugehörigen Linienbreiten, nur unwesentlich (Abb. 72 und 73). Diese Ergebnisse belegen den Erhalt der Integrität der Liposomen nach ihrer okklusiven Applikation, die bereits in den entsprechenden *In-vitro*-Untersuchungen nachgewiesen wurde.

Der Vergleich der ESR-Spektren von CAT-1-Lösung nach okklusiver Applikation *in vitro* mit den entsprechenden Spektren der *In-vivo*-Untersuchungen zeigt, dass es *in vivo* nicht zu einer Überlagerung des Singuletts mit einem Triplett kommt, das durch die penetrierten Anteile der Spinsonde hervorgerufen wird (Abb. 71 und 67). Der relative Anteil des breiten Singuletts am Gesamtspektrum schwankt während der gesamten Versuchsdauer um einen Mittelwert von 95,8 % (Abb. 72). Dieser Befund deutet zunächst darauf hin, dass die Spinsonde nicht in die Haut penetriert. Da jedoch unter den gewählten Versuchsbedingungen nicht mit einer grundsätzlich anderen Permeabilität der Haut für CAT-1 *in vitro* und *in vivo* gerechnet wird, müssen weitere Gründe für das Fehlen der Triplett-Komponente mit in Betracht gezogen werden: Im Gegensatz zu den exzidierten Hautproben werden Substanzen, die durch das Stratum corneum in die Haut penetrieren, aus der Dermis des lebenden Organismus über die Blutgefäße abtransportiert und im gesamten Organismus verteilt.

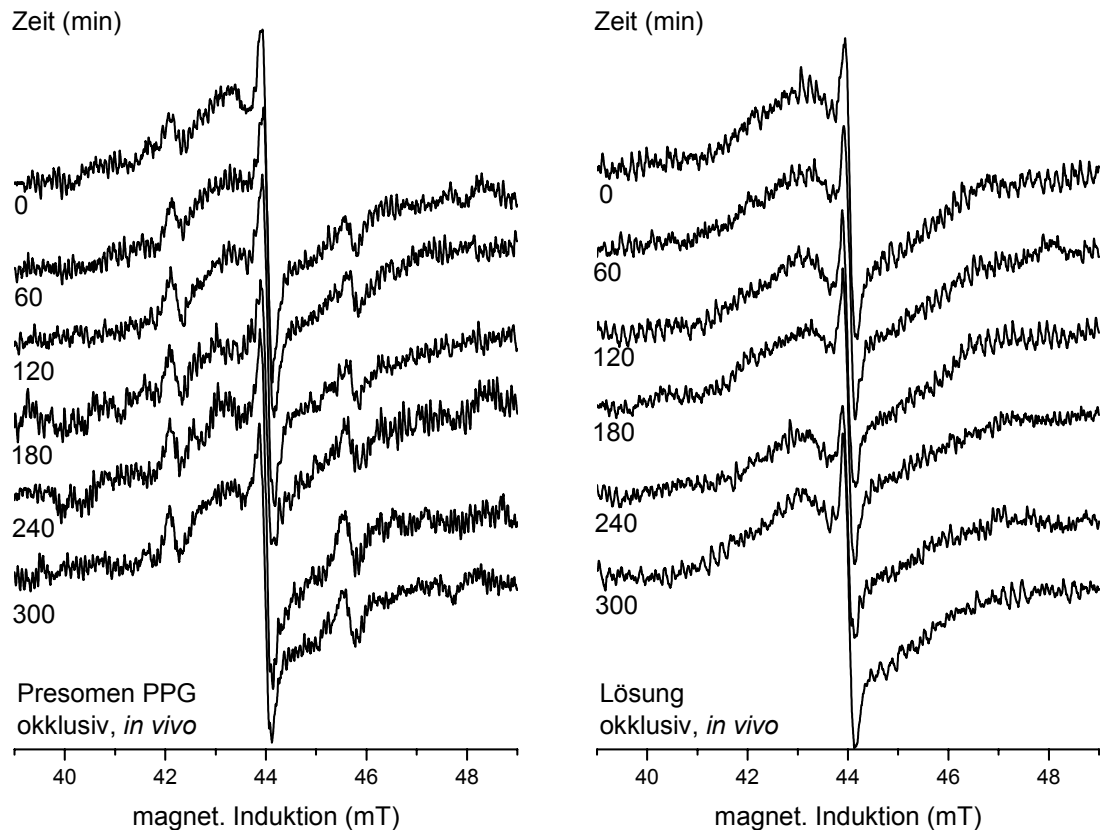


Abb. 71 *In-vivo* L-Band ESR-Spektren der Spinsonde CAT-1 (138 mM) verkapselt in Presomen® PPG-I-Liposomen bzw. in Lösung nach okklusiver Applikation mit DPPH als externem Standard

Die lokale Konzentration der Spinsonde wird dadurch verringert. Aufgrund der geringen CAT-1-Konzentration und dem geringen Signal-Rausch-Verhältnis der Spektren kann deshalb das zugehörige ESR-Signal-Triplett wahrscheinlich nicht detektiert werden. Ein weiterer Grund könnte auch die veränderte Reduktion der Radikale in der Haut sein. Für die Reduktion sind insbesondere Ascorbinsäure und verschiedene Enzymsysteme wie z. B. Cytochrom P-450, NADPH-abhängige Cytochrom P-450-Reduktase und das Thioredoxin-Thioredoxin-Reduktasesystem verantwortlich [27, 274]. Die Bereitstellung von Ascorbinsäure bzw. Energie für die Funktion der Enzyme ist an die Viabilität der Haut gebunden. Diese nimmt in den ersten Stunden nach der Entnahme jedoch stark ab [275, 276]. Es ist daher zu erwarten, dass die Reduktion der Radikale mit zunehmender Inkubationsdauer und Penetration von CAT-1 in die Haut vermindert wird. Durch die in der Folge entstehende höhere CAT-1-Konzentration kann die Triplett-Komponente im ESR-Spektrum unter *In-Vitro*-Bedingungen detektiert werden. Im Gegensatz zur exzidierten Haut kann *in vivo* von der kontinuierlichen

Bereitstellung der notwendigen Energie bzw. Ascorbinsäure ausgegangen werden, wodurch in die Haut eindringende Radikale reduziert werden und die Detektion der zugehörigen Triplett-Komponente verhindert wird.

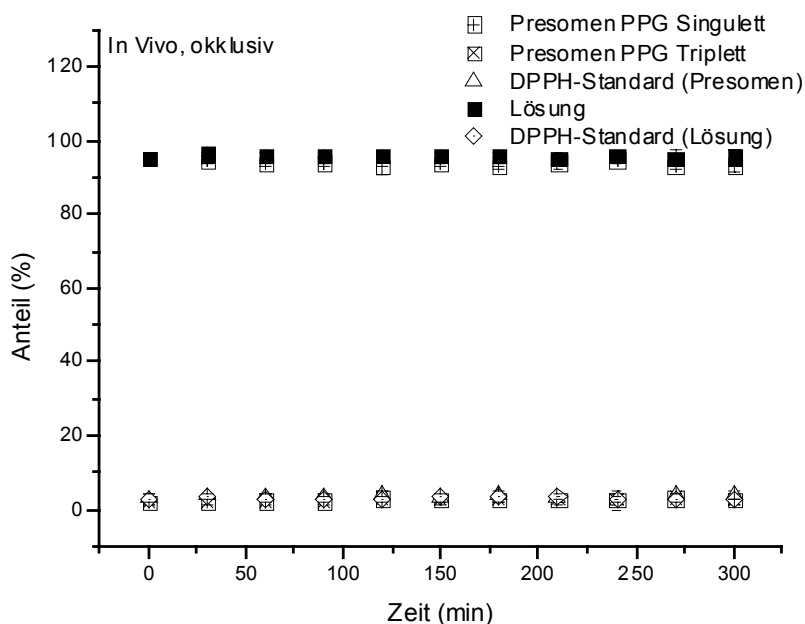


Abb. 72 Integrative Anteile der Singulett- bzw. Triplett-Komponente am Gesamtspektrum von CAT-1 in Abhängigkeit von der Zeit nach okklusiver Applikation der Liposomenformulierung bzw. der Lösung auf exzidierte Maushaut ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

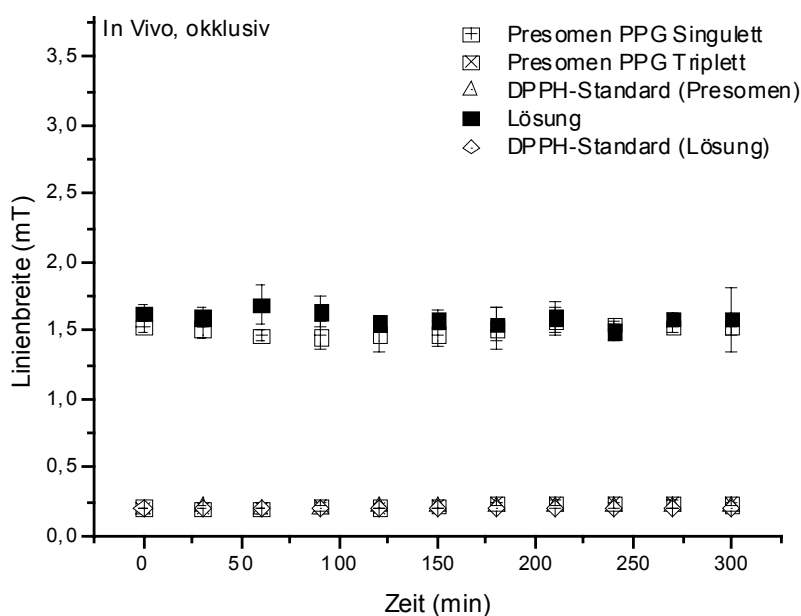


Abb. 73 Linienbreiten der Singulett- bzw. Triplett-Komponente von CAT-1 in Abhängigkeit von der Zeit nach okklusiver Applikation der Liposomenformulierung bzw. der Lösung auf exzidierte Maushaut ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Die Linienbreite des Singulett bleibt während der Untersuchung nahezu konstant, wodurch der Wasserverlust aus der Zubereitung, aber auch die Aufnahme von Wasser aus der Haut in die Zubereitung ausgeschlossen werden können (Abb. 73)

Die Signalintensitäten der untersuchten Zubereitungen blieben nach der epikutanen Applikation von CAT-1 in Presomen® C1-, Presomen® PPG-I-Liposomen bzw. Lösungen unter okklusiven Bedingungen während des Untersuchungszeitraumes nahezu konstant. Eine Reduktion der Spinsonde in der Haut konnte nicht nachgewiesen werden (Abb. 74).

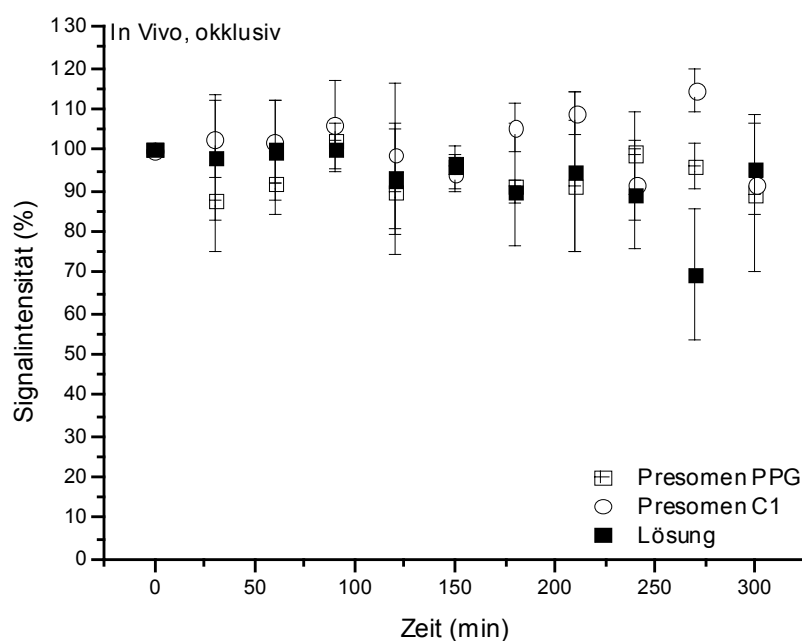


Abb. 74 Signalintensitäten der Spinsonde CAT-1 in Abhängigkeit von der Zeit nach okklusiver Applikation von Presomen® C1-, Presomen® PPG-I-Liposomen bzw. der Lösung auf exzidierte Maushaut ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

3.2.2.4 Subkutane Applikation

Die subkutane Applikation von Liposomen erlaubt ein Targeting der Lymphknoten, das insbesondere für die Behandlung mit Zytostatika, sowie antibakteriellen und antiviralen Wirkstoffen, von Interesse ist. Darüber hinaus werden weitere Einsatzgebiete für subkutan applizierte Liposomen erforscht, z.B die Vakzinierung und Rheumatherapie, mit dem Ziel einer verlängerten Antigenpräsenz bzw. lokalen Wirkstofffreisetzung. Dabei führt die Verkapselung von Proteinen bzw. Arzneistoffen in multilamellare oder multivesikuläre

Liposomen im Vergleich zu anderen Zubereitungen zu einer stark verzögerten Freisetzung, die sich nach extravasaler Injektion über mehrere Tage bis Wochen erstrecken kann [56 - 58]. Die Freisetzung der Wirkstoffe kann dabei durch die Zusammensetzung der Lipidmembran modifiziert werden, und ist aus Liposomen mit rigiden Lipidmembranen im Vergleich zu solchen mit fluiden Lipidmembranen deutlich verlangsamt [277]. Dagegen entscheidet die Größe der injizierten Liposomen über deren Aufnahme in das Lymphsystem und damit über die Verteilung im Körper [264].

Depotformulierungen auf der Grundlage von Liposomen erscheinen für die Applikation von hochpotenten Wirkstoffen wie z. B. Zytostatika, Peptiden (z. B. Interferone) bzw. Analgetika besonders geeignet zu sein [278, 279]. Entsprechende Zubereitungen befinden sich derzeit in der klinischen Prüfung (DepoMorphin[®], DepoBuvivacaine[™]) bzw. sind bereits zugelassen (Paxil[®]-CR, DepoCyt[®]) [59].

Nicht invasive Untersuchungen zum Verteilungsverhalten bzw. dem Depoteffekt von Liposomen wurden bisher nur mit radioaktiv markierten Substanzen durchgeführt. Durch die radioaktive Markierung von Phospholipiden bzw. anderen Bestandteilen der Lipiddoppelmembran sollte der Verbleib der Vesikel im Körper untersucht werden. Im Fall des Lipidaustauschs zwischen Liposomen und körpereigenen Strukturen, wie z. B. roten Blutkörperchen, ist das radioaktive Signal nicht zwangsläufig an die injizierten Vesikel gebunden. Die Ergebnisse dieser Studien sind daher kritisch zu beurteilen.

Im folgenden Versuchsteil sollte daher mit Hilfe der ESR-Spektroskopie untersucht werden, ob es nach der subkutanen Injektion von Liposomen zur Ausbildung eines lokalen Wirkstoffdepots am Injektionsort kommt. Weiterhin sollte die Integrität der Vesikel und deren Bedeutung für den Depoteffekt von Liposomen untersucht werden. Dazu wurden CAT-1-Lösungen (138 mM) ebenso wie in den vorangegangenen Untersuchungen in multilamellare Liposomen eingeschlossen, und nicht verkapselte Anteile der Spinsonde aus der Zubereitung entfernt. Die Zubereitungen wurden am Rücken von Nacktmäusen oberhalb des Schwanzansatzes subkutan injiziert. Die Untersuchung der Integrität der Vesikel erfolgte durch die Aufzeichnung der spektralen Information über der Applikationsstelle. Die systemische Verteilung von CAT-1 im Körper wurde dagegen durch die Aufzeichnung der spektralen Information über der Brust der Tiere untersucht. Durch den Vergleich von multilamellaren Liposomen aus Presomen[®] C1

und solchen aus Presomen® PPG-I sollten Informationen über den Einfluss der Begleitstoffe von Sojabohnenlipiden auf die Freisetzung von CAT-1 gewonnen werden. Als Referenz diente eine wässrige Lösung der Spinsonde.

Nach der subkutanen Injektion der liposomal verkapselten Spinsonde in Nacktmäuse wurden ESR-Spektren registriert, die aus der Überlagerung von drei Einzelkomponenten bestehen (Abb. 75). Die Gesamtspektren setzen sich aus einem Triplet mit geringer Signalintensität, einem Singulett mit geringer Linienbreite und einem sehr breiten Singulett mit geringer Amplitude zusammen.

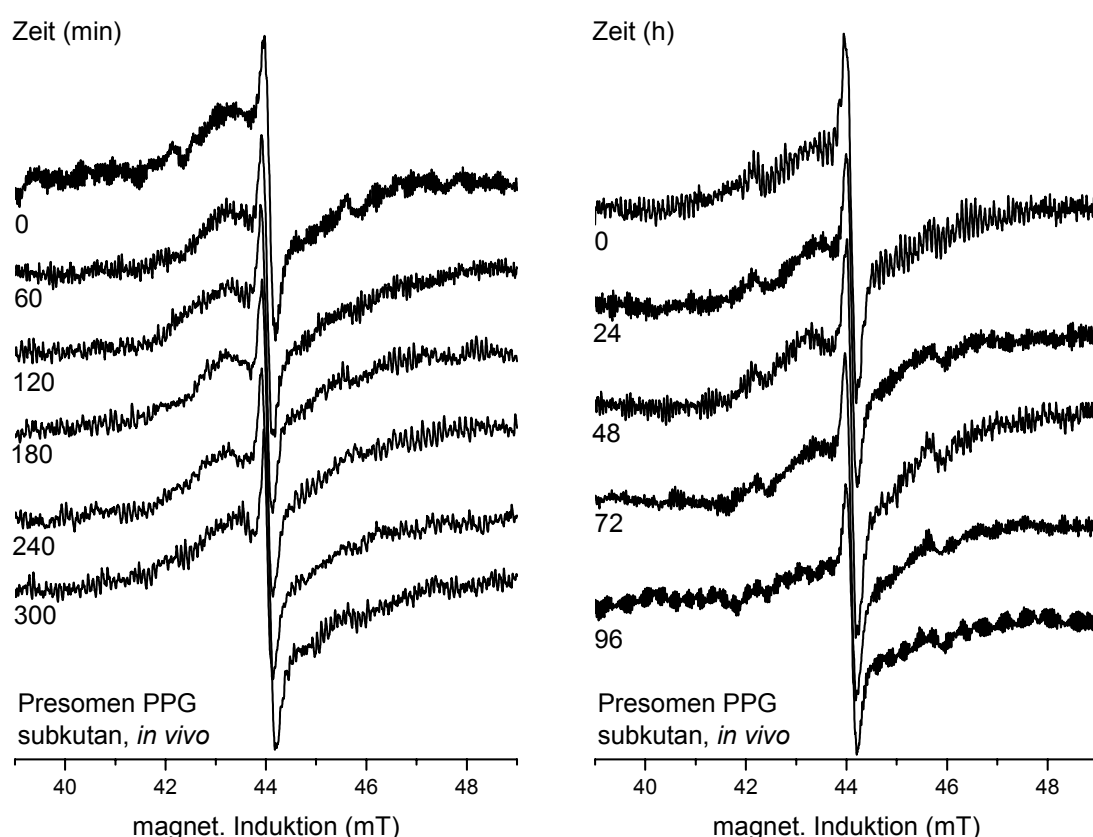


Abb. 75 *In-vivo* L-Band ESR-Spektren der Spinsonde CAT-1 (138 mM) verkapselt in Presomen® PPG-I-Liposomen nach subkutaner Injektion in Nacktmäuse in Abhängigkeit von der Zeit mit DPPH als externem Standard

Während der mitgeführte externe DPPH-Standard als Singulett mit geringer Linienbreite im Gesamtspektrum detektiert wurde, konnten die in den Liposomen verkapselten Anteile von CAT-1 dem Singulett mit der großen Linienbreite und der kleinen Amplitude zugeordnet werden. Im Verlauf der Untersuchung wurden über den Untersuchungszeitraum von

96 Stunden ESR-Signale aufgezeichnet, die aus diesen beiden Einzelkomponenten bestanden, und deren Linienform damit den Erhalt der Vesikelstruktur der Liposomen nach subkutaner Injektion belegen. Die dritte Einzelkomponente des Gesamtspektrums, d. h. das Signal-Triplett, kann nicht verkapselten bzw. während der Injektion freigesetzten Anteilen der Spinsonde zugeordnet werden. Der mit abnehmender Konzentration der Spinsonde auftretende Übergang des ESR-Signals von einem Singulett in ein Signal-Triplett geht auf die dabei abnehmenden Spinaustausch- und Dipol-Dipol-Wechselwirkungen zurück (s.o.). Der Übergang des Singuletts in ein Triplett bzw. die Detektion eines Triplettts belegt daher die Freisetzung von CAT-1 aus dem wässrigen Innenvolumen der Liposomen. Die geringen Anteile an nicht verkapselter Spinsonde, die in der Formulierung vorlagen und in dem ersten aufgezeichneten Spektrum als Triplett das Gesamtspektrum überlagern, wurden innerhalb der ersten Stunden soweit reduziert, dass eine Differenzierung zwischen dem Signal und dem Grundrauschen nur noch schwer möglich ist. In einer der untersuchten Formulierungen konnte der Triplett-Anteil bereits nach zwei Stunden nicht mehr nachgewiesen werden. Die Reduzierung von freigesetzten Anteilen der Spinsonde belegt im Fall der Liposomen somit die Bedeutung der Vesikelstruktur für die Depotwirkung. In den ESR-Spektren, die im Zeitraum von 24 bis 96 Stunden nach der Injektion der Zubereitungen aufgezeichnet wurden, kann das Triplett-Signal dagegen deutlich vom Basisrauschen unterschieden werden. Dadurch wird belegt, dass nach 24 Stunden eine kontinuierliche Freisetzung der Spinsonde aus den Liposomen eintritt.

Nach der subkutanen Injektion der Zubereitung konnten über der Brust der Tiere keine ESR-Signale von CAT-1 aufgezeichnet werden. Der Übergang von Liposomen in das Lymphsystem bzw. die systemische Verteilung der Spinsonden konnte unter den gewählten Bedingungen nicht nachgewiesen werden.

Die durch Spektrensimulation ermittelten Anteile der Einzelkomponenten am Gesamtspektrum (Abb. 76) blieben im Untersuchungszeitraum, ebenso wie die Linienbreiten der Einzelkomponenten (Abb. 77), nahezu konstant. Da Veränderungen der Konzentration von CAT-1 im Inneren der Liposomen mit Änderungen der spektralen Linienbreiten verbunden sind (Tab. 7), können diese damit ausgeschlossen werden. Die Freisetzung der Spinsonde aus dem Inneren der Vesikel beruht daher wahrscheinlich nicht auf einer Diffusion der Spinsonde durch die Lipiddoppelmembran der Liposomen, sondern auf einem Abbau der Vesikel, bei

dem der gesamte Inhalt der Liposomen auf einmal freigesetzt wird.

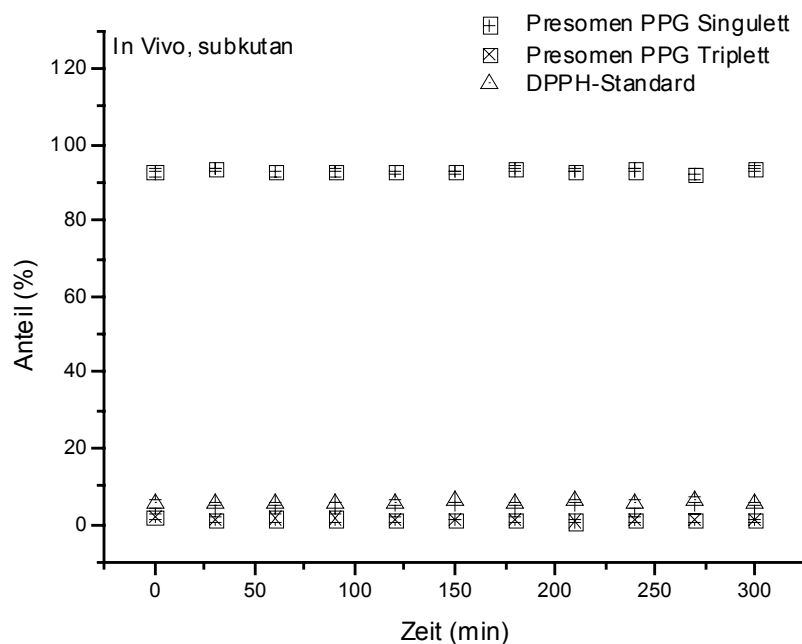


Abb. 76 Integrale Anteile der Singulett- bzw. Triplett-Komponente am Gesamtspektrum von CAT-1 in Abhängigkeit von der Zeit nach subkutaner Injektion von Presomen® PPG-I-Liposomen in Nacktmäuse ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

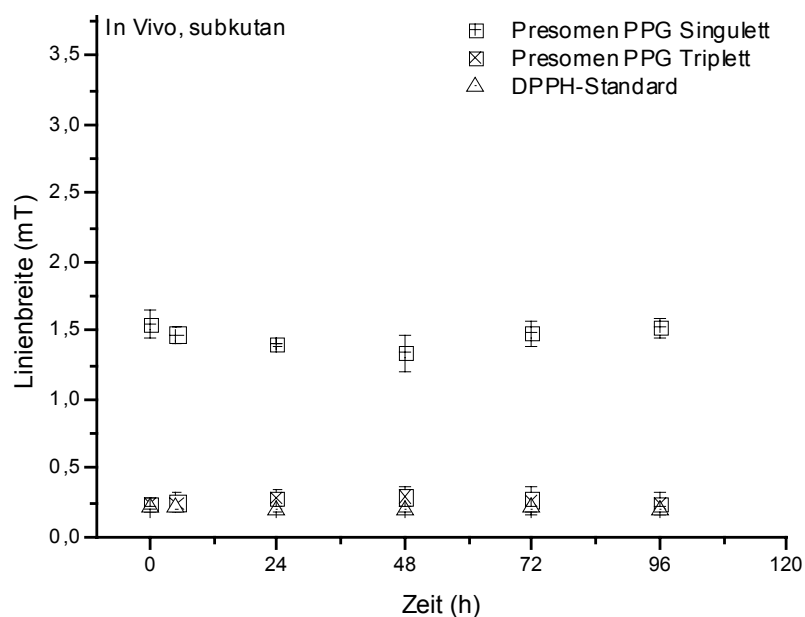


Abb. 77 Linienbreiten der Singulett- bzw. Triplett-Komponente von CAT-1 in Abhängigkeit von der Zeit nach subkutaner Injektion von Presomen® PPG-I-Liposomen in Nacktmäuse ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Nach der Injektion von CAT-1-Lösungen (138 mM) konnte eine rasche Abnahme der

Spinsonden-Konzentration durch die Veränderung der Form der registrierten ESR-Spektren am Injektionsort festgestellt werden (Abb. 78).

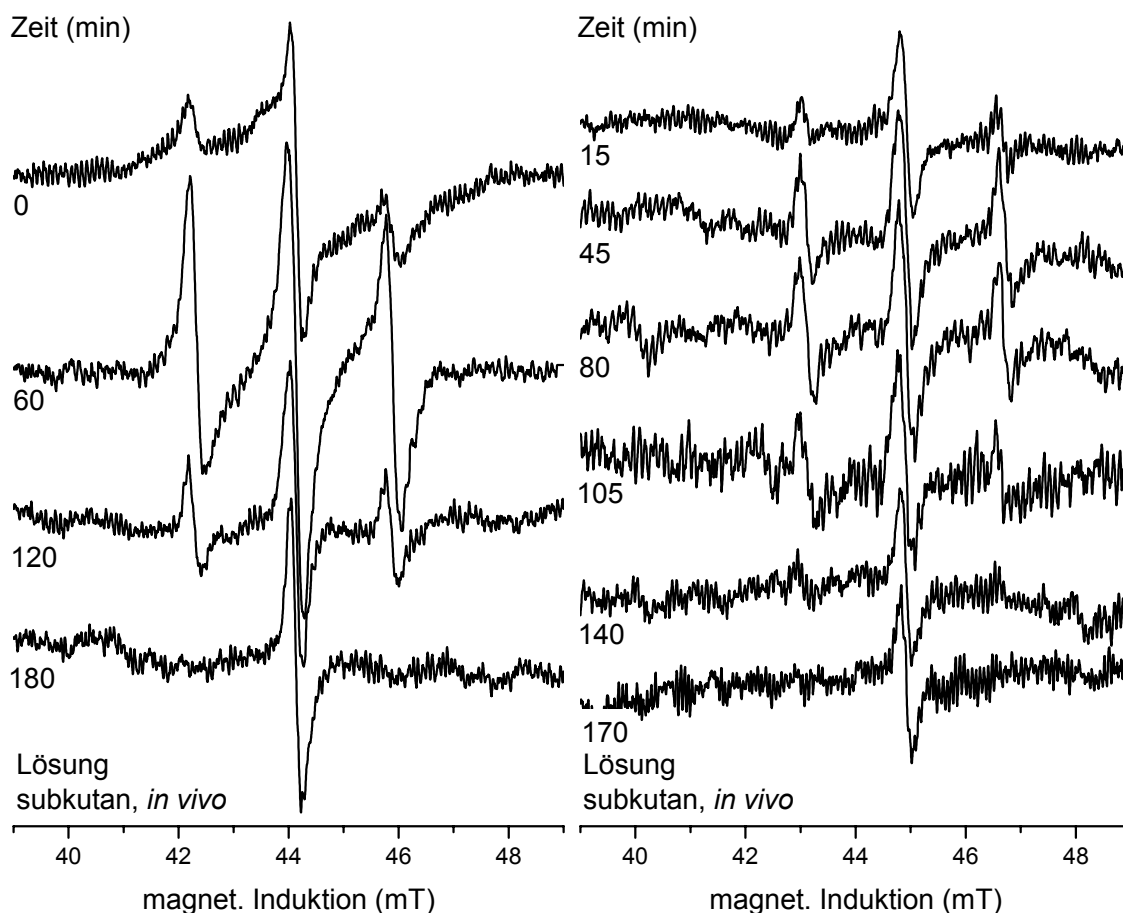


Abb. 78 *In-vivo* L-Band ESR-Spektren einer CAT-1-Lösung (138 mM) nach subkutaner Injektion in Nacktmäuse in Abhängigkeit von der Zeit; aufgezeichnet über dem Rücken (links) bzw. der Brust (rechts) mit DPPH als externem Standard

Während das unmittelbar nach der Injektion aufgezeichnete Spektrum aus dem schmalen Singulett des DPPH-Standard, dem breiten Singulett von CAT-1 in Lösung und der Überlagerung einer Triplet-Komponente besteht, dominiert letztere das nach 30 min aufgezeichnete Spektrum bereits so stark, dass die beiden anderen Komponenten nur durch Spektrensimulation nachgewiesen werden konnten. Der Anteil der Triplet-Komponente am Gesamtspektrum nimmt mit zunehmender Verdünnung der Spinsonden-Lösung am Injektionsort von ca. 9 % am Start auf ca. 88 % nach 60 min zu (Abb. 79). Gleichzeitig steigt die Amplitude des Triplets durch die Abnahme der Spinaustausch- und Dipolwechselwirkungen, sowie die damit verbundene Abnahme der Linienbreiten an (Abb. 80). Während der Anteil der Triplet-

Komponente im weiteren Verlauf der Untersuchung abnimmt, und bereits nach 180 min kein CAT-1-Spektrum am Injektionsort mehr detektiert werden kann, steigt der Anteil des DPPH-Standard am Gesamtspektrum im gleichen Zeitraum auf 100 % an, wodurch die Reduktion der Sonde bzw. deren systemische Verteilung belegt wird. Die Verteilung der Sonde im Körper kann auch anhand der ESR-Spektren nachgewiesen werden, die über der Brust der Tiere aufgezeichnet wurden (Abb. 78). Bereits nach 15 min konnte neben dem Singulett des DPPH-Standards ein Triplett von geringer Intensität festgestellt werden, das auf die injizierte Spinsonde zurückgeht. In den nach 45 und 80 min aufgezeichneten Spektren hatte das Triplett eine annähernd gleiche Signalintensität. Diese war im Vergleich zu dem nach 15 min aufgezeichnetem Spektrum deutlich erhöht. Im weiteren Verlauf nahm die Signalintensität aufgrund der Reduktion der Radikale ab, bis nach 170 min kein Triplett-Signal mehr detektiert werden konnte. Die Ergebnisse belegen eine schnelle Verteilung von CAT-1 im gesamten Körper.

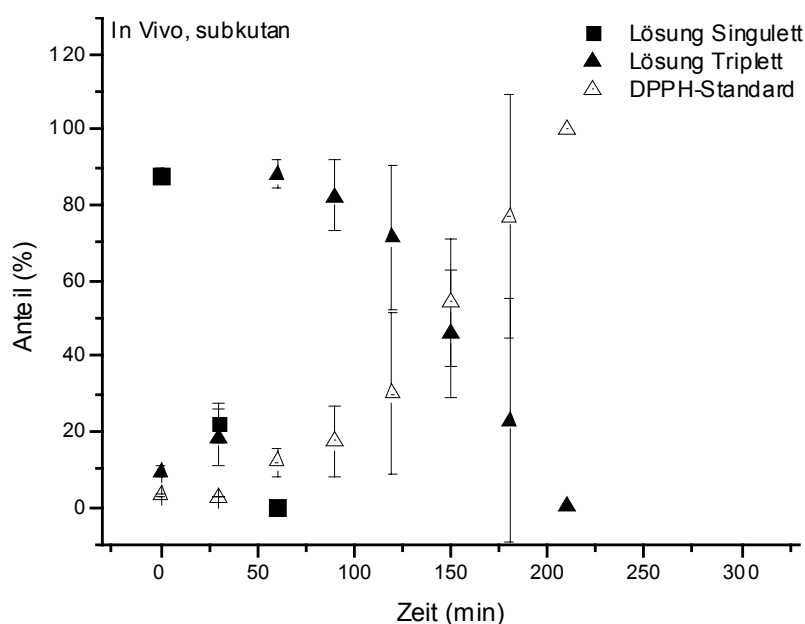


Abb. 79 Integrale Anteile der Singulett- bzw. Triplett-Komponente am Gesamtspektrum von CAT-1 in Abhängigkeit von der Zeit nach subkutaner Injektion von Lösungen in Nacktmäuse ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Die Signalintensität der Spinsonde am Injektionsort nimmt exponentiell ab. Nach logarithmischer Darstellung der relativen Signalintensitäten und linearer Kurvenanpassung ergibt sich für die Reaktion erster Ordnung eine Geschwindigkeitskonstante von $k_{\text{Reduktion}} (\text{min}^{-1}) = 0,011$ (Abb. 81, Lösung). Tritt während der Injektion der Lösung die Bildung eines Ödems am

Injektionsort auf, wird dadurch die Geschwindigkeitskonstante auf einen Wert von $k_{\text{Reduktion}} = 0,004 \text{ min}^{-1}$ verringert (Abb. 81, Lösung Ödem), mit der Folge, dass am Injektionsort über 300 min ein Signal-Triplett mit geringer Linienbreite detektiert werden kann. Die Zeit, nach der ESR-Signale über der Brust registriert werden können, wird ebenso wenig durch die Ödembildung am Injektionsort beeinflusst, wie der Zeitraum in dem diese Signale registriert werden können.

Im Gegensatz zu Lösungen wird CAT-1 aus Liposomen nur sehr langsam im Körper verteilt. Die Reduktion der freigesetzten Spinsondenanteile erfolgte schneller als deren systemische Verteilung, weshalb über der Brust der Tiere keine ESR-Signale registriert werden konnten. Die Abnahme der Signalintensität erfolgt im Gegensatz zu den Lösungen nicht exponentiell, sondern linear. Die durch lineare Kurvenanpassung bestimmten Geschwindigkeitskonstanten der Zubereitungen mit den Lipidgrundlagen Presomen[®] C1 bzw. Presomen[®] PPG-I unterscheiden sich geringfügig voneinander ($k_{\text{Reduktion}} = 0,4410 \text{ \%h}^{-1}$ bzw. $k_{\text{Reduktion}} = 0,4775 \text{ \%h}^{-1}$). Danach wird die Spinsonde aus Liposomen, deren Lipiddoppelmembranen aus Ei-lipiden bestehen, geringfügiglangsamer freigesetzt als aus solchen, deren Lipiddoppelmembranen aus partialsynthetischen Lipiden zusammengesetzt sind.

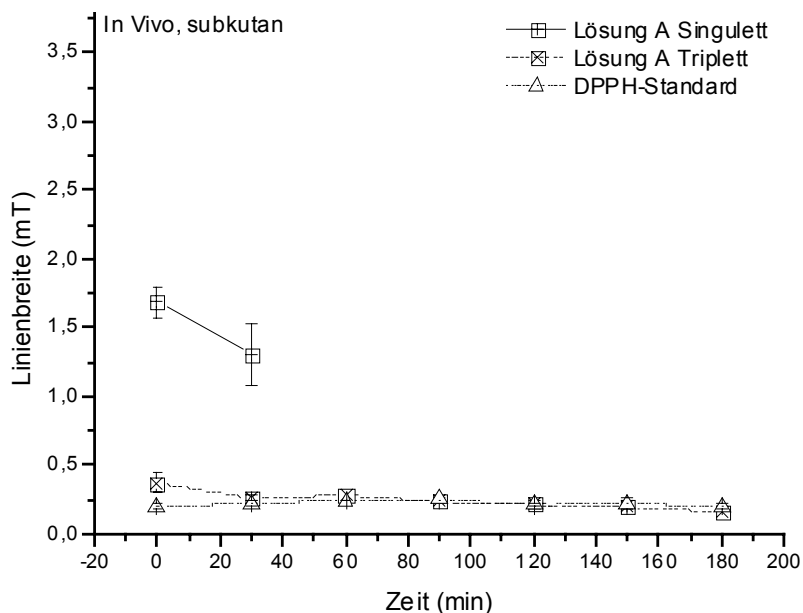


Abb. 80 Linienbreiten der Singulett- bzw. Triplett-Komponente von CAT-1 in Abhängigkeit von der Zeit nach subkutaner Injektion von Lösungen in Nacktmäuse ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

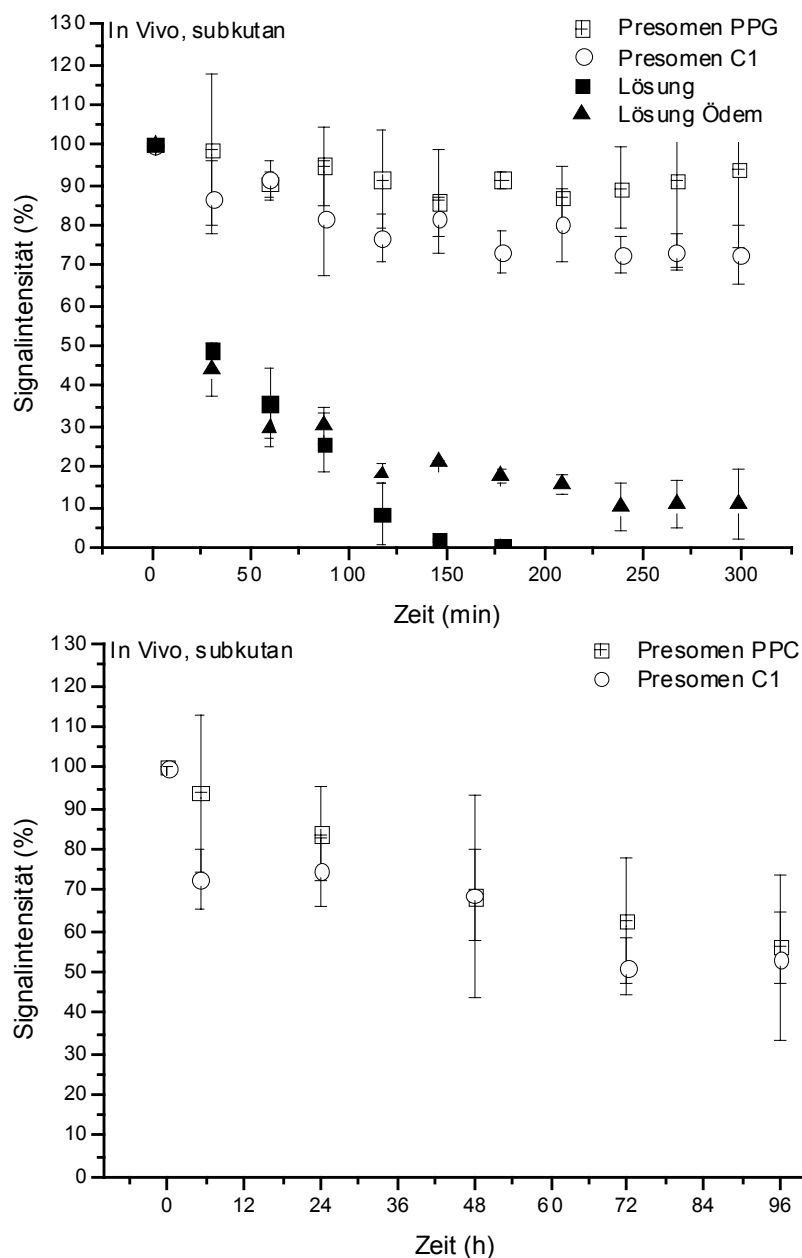


Abb. 81 Signalintensitäten der Spinsonde CAT-1 in Abhängigkeit von der Zeit nach subkutaner Injektion von Presomen® C1-, Presomen® PPG-I-Liposomen bzw. Lösungen in Nacktmäuse; ohne Ödembildung (Lösung A) bzw. mit Ödembildung (Lösung B) ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Die Auswertung der ESR-Spektren, die über dem Injektionsort bzw. der Brust der Tiere aufgezeichnet wurden, macht die Unterschiede zwischen Liposomen und Lösungen in Bezug auf den Depot-Effekt und die systemische Verteilung nach subkutaner Injektion deutlich. Liposomen sind in der Lage, CAT-1 in einem lokalen Depot unter der Haut zu binden, und vor der Reduktion durch Enzyme bzw. Reduktionsmittel zu schützen. Dadurch liegen am

Ende des Untersuchungszeitraums, d.h. 96 h nach der Injektion, in Liposomen noch ca. 60 % der Spinsonde am Injektionsort vor während nach der Injektion in Lösungen die Spinsonde rasch im gesamten Körper verteilt und innerhalb von 180 min vollständig reduziert wird. Die Ergebnisse der durchgeführten Untersuchung zeigen, dass Liposomen nach der subkutanen Applikation ihre Integrität beibehalten, und dass der Depoteffekt und der Reduktionsschutz an die Integrität der Vesikel gebunden ist.

Wenn Liposomen subkutan in den Körper eingebracht werden, können maßgeblich zwei Dinge passieren: (1) Inhaltsstoffe der Liposomen können freigesetzt werden, wobei die Liposomen unter dem Einfluss von Umgebungsfaktoren zerfallen oder intakt bleiben können und /oder (2) die Vesikel werden mit der Lymphflüssigkeit bzw. dem Blut durch das Gewebe transportiert wo ein Teil von Zellen aufgenommen wird. Dass die Freisetzung der Spinsonden unter Beibehaltung der Integrität der Liposomen jedoch ausgeschlossen werden kann, soll nachfolgend erläutert werden. Ein Vergleich der Linienbreiten zwischen den Singulett Komponenten der ESR-Spektren der ursprünglichen Zubereitung und den Linienbreiten der subkutan injizierten Liposomen zeigt, dass diese nahezu übereinstimmen. Dieses Ergebnis lässt den Schluss zu, dass die Konzentration der CAT-1 Lösungen im Inneren der Liposomen unter der Haut im Untersuchungszeitraum nicht erheblich verändert worden ist. Eine massive Freisetzung der Spinsonde aus den intakten Liposomen in die Umgebung kann daher ausgeschlossen werden. Dies wird auch dadurch belegt, dass zur Simulation der experimentellen ESR-Spektren nicht mehr als zwei Spezies und zwar die Spektren der verkapselten und der freigesetzten Spinsonde benötigt wurden. Um den, im Fall einer Permeation der Spinsonde aus den Liposomen, entstehenden Konzentrationsgradienten innerhalb der Liposomen simulieren zu können sind jedoch mehr als nur zwei Einzelkomponenten notwendig, wie dies am Beispiel der Freisetzung von CAT-1 aus Liposomen in Natriumascorbat-Lösung gezeigt werden konnte. Die während des Untersuchungszeitraums auftretende Konzentrationsabnahme der Spinsonde am Injektionsort ist daher wahrscheinlich nicht auf eine Freisetzung der Spinsonde unter Beibehaltung der Liposomenintegrität zurückzuführen. Vielmehr beruht diese auf einem möglichen Abtransport der Vesikel über das Lymphsystem oder auf einem Abbau von Liposomen durch Phagozytose, Adsorption oder Fusion der Liposomen mit Zellen des umliegenden Gewebes [226]. Gegen einen Abtransport der Vesikel vom Injektionsort

spricht, dass die Geschwindigkeitskonstanten der Spinsondenreduktion in Formulierungen mit Liposomen aus Presomen[®] C1 und Presomen[®] PPG-I nahezu übereinstimmen. Für den Fall eines massiven Abtransports der Liposomen über das Lymphsystem hätten sich die Geschwindigkeitskonstanten deutlich unterscheiden müssen. Dies kann damit begründet werden, dass in Formulierungen aus Presomen[®] PPG-I 40 % in Formulierungen aus Presomen[®] C1 jedoch nur 10 % der Liposomen kleiner sind als 0,4 µm und damit nach dem von Oussoren angegebenen Größenbereich [264], potentiell für eine Aufnahme in das Lymphsystem zur Verfügung stehen. Fehlende CAT-1 Signale in den ESR Spektren die über der Brust der Tiere detektiert wurden bestätigen zudem, dass die injizierten multilamellaren Liposomen am Injektionsort verbleiben. Die Abnahme der Signalintensität von CAT-1 ist daher wahrscheinlich auf einen Abbau der Vesikel am Injektionsort zurückzuführen. In Bezug auf den Abbau der Vesikel bzw. die Spinsondenreduktion konnten zwischen Liposomen aus partialsynthetischen Lipiden und solchen aus Ei-Lecithin keine Unterschiede festgestellt werden.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Integrität und Verteilung von Liposomen in lebenden Mäusen nicht invasiv mit Hilfe der *in vivo* ESR Spektroskopie untersucht werden konnte. Dabei konnte die Bedeutung der Integrität von Liposomen in Bezug auf Ihren Depoteffekt nachgewiesen werden.

3.2.3 Diskussion

Die Untersuchungen zur Integrität von epikutan applizierten uni- und multilamellaren Liposomen ergaben, dass unilamellare Liposomen ihre Integrität schneller verlieren als multilamellare Liposomen und solche aus nicht hydrierten Phospholipiden schneller als Liposomen aus hydrierten Phospholipiden. Mit einem neu entwickelten Versuchsansatz, bei dem die Freisetzung von CAT-1 direkt anhand von spektralen Veränderungen registriert werden kann, wurde untersucht, wie lange intakte Liposomen unter nicht okklusiven bzw. okklusiven Bedingungen auf der Haut *in vitro* und *in vivo* als Wirkstoffdepot zur Verfügung stehen. Der Vorteil dieses Versuchsansatzes, bei dem liposomal verkapselte Anteile der Spinsonde ein Singulett Signal und freigesetzte Anteile ein Triplett Signal aufweisen, gegenüber der bisher in der Literatur beschriebenen Methode zur Untersuchung der Freisetzung von

hydrophilen ESR-Spinsonden aus Liposomen besteht darin, dass auf den Zusatz von Natriumascorbat als die Freisetzungsgeschwindigkeit stark erhöhendes Reduktionsmittel verzichtet werden kann. Dadurch wurde es möglich, die Stabilität für einen Teil der epikutan applizierten multilamellaren Liposomen aus den Lipidgrundlagen Presomen[®] C1 und Presomen[®] PPG-I über 300 Minuten *in vitro* nachzuweisen. Gleichzeitig konnte über eine Veränderung der spektralen Eigenschaften der freigesetzten und der verkapselten Anteile belegt werden, dass der zunehmende Wasserverlust aus der Formulierung zu einer Erhöhung der Spinsondenkonzentration sowohl in der äußeren als auch in der inneren Phase der Liposomen führt. Im Vergleich zu ebenfalls epikutan applizierten Lösungen konnte gezeigt werden, dass Liposomen den Wasserverlust aus der Zubereitung stark verzögern und dadurch eine Kristallisation der Spinsonde aus der Zubereitung verhindern. Letztere konnte durch *In-vivo*-Untersuchungen in epikutan auf Nacktmäuse applizierten Liposomenzubereitungen nachgewiesen werden, aus denen der Wasserverlust aufgrund der Körpertemperatur der Tiere beschleunigt ist. Unter okklusiven Bedingungen erweisen sich die untersuchten multilamellaren Liposomen über 300 Minuten sowohl *in vitro* als auch *in vivo* als stabil. Diese erhöhte Stabilität und die dadurch verminderte Kontaktfläche zwischen den Liposomen und der Haut könnte der Grund für die verminderte Penetration von okklusiv applizierten, liposomal eingeschlossenen Arzneistoffen sein, über die einige Autoren berichten. Dagegen konnte für CAT-1, das in Lösungen epikutan appliziert wurde, *in vitro* eine Penetration in die Haut nachgewiesen werden, und damit die in der Literatur beschriebene verstärkte Hautpenetration von Arzneistoffen unter okklusiven Bedingungen bestätigt werden. Unter *In-vivo*-Bedingungen war dies wahrscheinlich aufgrund des Abtransports von CAT-1 über das Blut und Lymphsystem in der Haut und die dadurch verminderten Signalintensitäten nicht möglich.

In weiteren Untersuchungen wurde die Integrität von Liposomen nach subkutaner Injektion nicht invasiv mit Hilfe der L-Band-ESR *in vivo* untersucht. Nach der subkutanen Injektion von Liposomen, die zur Ausbildung von Depots hochpotenter Arzneistoffe ausgenutzt wird, konnten intakte Liposomen bis zum Ende der Untersuchung nach 96 Stunden am Injektionsort nachgewiesen werden. Da zu diesem Zeitpunkt noch ca. 60 % der injizierten Spinsonden am Injektionsort nachweisbar sind, ist mit ihrer erheblich langsameren Freisetzung zu rechnen. Die Reduktion von freigesetzten Anteilen der Spinsonde innerhalb der ersten Stunden nach

der Injektion belegt die Bedeutung der Vesikelstruktur für den Depoteffekt von Liposomen. Anhand der spektralen Informationen konnte zwischen 24 und 96 Stunden eine kontinuierliche Freisetzung der Spinsonde belegt werden. Im Unterschied zu den injizierten Liposomen führt die subkutane Applikation von CAT-1 in Lösungen nicht zu einer Fixierung der Spinsonde in einem lokalen Depot, sondern zu einer raschen Absorption, systemischen Verteilung und Reduktion der Spinsonde.

3.3 Wechselwirkungen von Liposomen mit dem Stratum corneum und der Einfluss auf die Mobilität von Spinsonden

Neben der Stabilität von Liposomen auf der Haut bzw. den Wechselwirkungen von Liposomen mit dem Stratum corneum und tieferen Hautschichten ist die Fixierung von epikutan applizierten Arzneistoffen durch Liposomen und Liposomenbestandteile von besonderem Interesse. Während die Verstärkung der Penetration von Arzneistoffen und Modellsubstanzen in die Haut aus Liposomenformulierungen bereits in einer Vielzahl von Artikeln untersucht wurde [60, 223, 280, 281], finden sich in der neueren Literatur nur wenige Angaben zu den Wechselwirkungen der Liposomenbestandteile mit den intercorneozytären Lipiddoppelschichten des Stratum corneum [60, 61, 236] bzw. zur Fixierung und Mobilität von Arzneistoffen und Modellsubstanzen nach deren epikutaner Applikation [282 - 284]. Neben der Zusammensetzung der Liposomenmembranen könnte besonders die Mobilität von Arzneistoffen in dem auf der Haut entstehenden Lipidfilm ein wichtiger Einflussfaktor für den unterschiedlich stark ausgeprägten penetrationsfördernden Effekt von Liposomenformulierungen sein. *Nachfolgend sollte daher die Mobilität der hydrophilen Spinsonde CAT-1 bzw. der lipophilen Spinsonde 5-Doxylpalmitinsäure nach der nicht okklusiven Applikation ausgewählter Liposomenformulierungen charakterisiert werden.* Dabei sollte die Auswertung der Mobilität von CAT-1 Aufschluss über die mit zunehmendem Wasserverlust ansteigende Immobilisierung der Spinsonde und deren Einbindung in den auf dem Stratum corneum entstehenden Lipidfilm geben. *Durch die Auswertung der Mobilität von 5-Doxylpalmitinsäure sollte dagegen die Beweglichkeit der Phospholipide in der Liposomenmembran vor und nach deren Applikation charakterisiert werden.* Fluiditätsänderungen der Stratum corneum-Lipide als Maß für die Wechselwirkungen zwischen dem SC und epikutan applizierten Liposomenbestandteilen wurden anhand der Mobilität der Sonde in humaner Epidermis untersucht.

3.3.1 Mobilität von CAT-1 nach epikutaner Applikation von Liposomen

Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Liposomenformulierungen, die epikutan appliziert wurden, zeigen, dass in Abhängigkeit von der Zeit eine massive Fusion der Vesikel

stattfindet. Die mit zunehmendem Wasserverlust entstehenden Bilayerstapel überziehen die Oberfläche der Haut mit einem Lipidfilm, der als Wirkstoffdepot dienen könnte [vgl. 165]. *In welcher Form hydrophile Modellschubstanzen in diesem Depot vorliegen, sollte nachfolgend anhand der ESR-Spektren und Mobilität von CAT-1 untersucht werden.* Dazu wurde CAT-1 in Liposomenzubereitungen auf das Stratum corneum von hitzeseparierter humaner Epidermis appliziert. Nach 0; 1,0; 2,0; 3,5; 7,0 und 24 h wurden S-Band-ESR-Spektren der Proben aufgezeichnet. Die Auswertung der ESR-Spektren erfolgte mit Hilfe des Computerprogramms PEST [253]. Die Mobilität der Spinsonde wurde mit Hilfe der folgenden empirischen Beziehung^c [285 - 287] anhand der simulierten Spektren der Einzelkomponenten des gemessenen Gesamtspektrums bestimmt (vgl. 7.5.1):

$$\tau_R = 6.5 \cdot 10^{-10} \Delta B_0 (\sqrt{h_0 / h_{-1}} - 1) \quad (1)$$

ΔB_0 : Linienbreite der mittleren Linie

h_0/h_{-1} : Intensitätsverhältnis der mittleren zur Hochfeldlinie des Drei-Linien-Spektrums

Die zur Berechnung der Rotationskorrelationszeit τ_R nach Gleichung 1 notwendigen Parameter können aus einem Spektrum wie in Abb. 82 dargestellt entnommen werden.

Der Einfluss der Lipidgrundlage auf die Beweglichkeit von CAT-1 sollte durch die Applikation von Liposomenformulierungen mit den Lipidgrundlagen DOPC/CH/PG bzw. DPPC/CH/PG und variierendem Cholesterolanteil ermittelt werden.

Nach der Applikation der verschiedenen Liposomenzubereitungen auf das Stratum corneum von hitzeseparierter Epidermis wurden die in Abb. 83 dargestellten ESR-Spektren von CAT-1 aufgezeichnet. Die zum Startzeitpunkt (0 h) registrierten Spektren weisen in allen Formulie-

^c Die empirische Beziehung liefert bei der Anwendung auf X-Band-ESR-Spektren akzeptable Rotationskorrelationszeiten. Die Vergleichbarkeit der in diesem Kapitel angegebenen Werte für τ_R beschränkt sich auf Rotationskorrelationszeiten, die ebenfalls aus S-Band-ESR-Spektren mit der empirischen Beziehung berechnet wurden (vgl. 3.4.2). Das Computerprogramm nach Freed (vgl. 3.4.2), mit dem Rotationskorrelationszeiten unabhängig von der eingesetzten Mikrowellenfrequenz ermittelt werden können, war in dieser Phase der Bearbeitung des Themas noch nicht zugänglich.

rungen drei Linien mit nahezu identischer Amplitude auf. Mit zunehmender Zeit stiegen die Linienbreiten der ESR-Signale an. Dieser Anstieg ist auf die mit steigendem Wasserverlust zunehmende Konzentration der Spinsonde in der applizierten Formulierung und die in der Folge zunehmenden Dipol-Dipol- und Spinaustauschwechselwirkungen zurückzuführen.

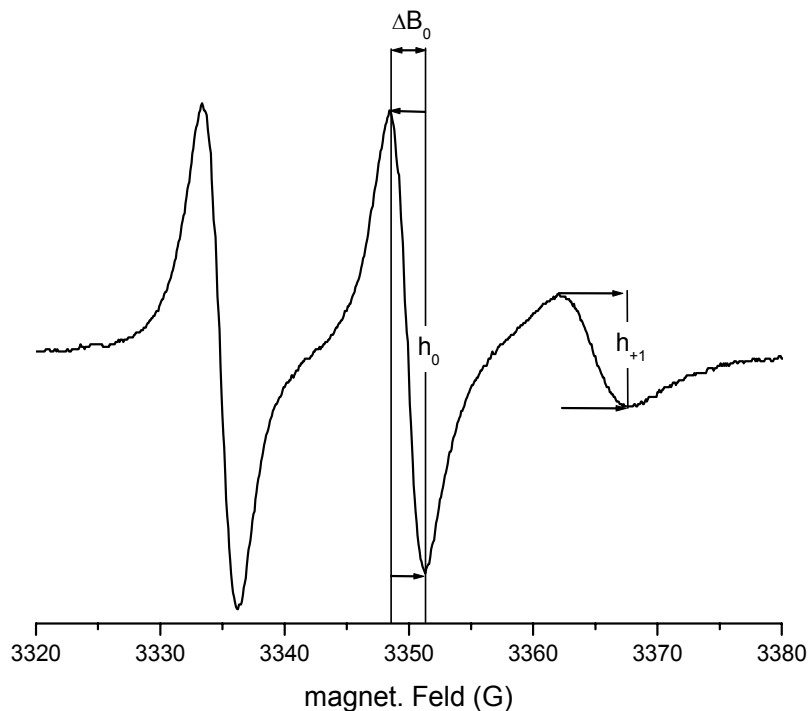


Abb. 82 ESR-Spektrum der Spinsonde CAT-1 in einer Glycerol-Wasser-Mischung. Eingezeichnet sind die zur Berechnung der Rotationskorrelationszeit τ_R nach Gleichung 1 notwendigen Parameter

In den nach einer Stunde registrierten Spektren von CAT-1 ist eine deutliche Verschiebung des Niederfeld- bzw. Hochfeldpeaks vom Niveau der Basislinie, d.h. nach oben bzw. unten, zu erkennen, die darauf hindeutet, dass die registrierten Gesamtspektren eine Überlagerung verschiedener spektraler Anteile darstellen. Im weiteren Verlauf der Untersuchung ergaben sich Unterschiede zwischen den Formen der ESR-Spektren von CAT-1 in den einzelnen Zubereitungen. Nach der epikutanen Applikation von CAT-1 in DOPC/CH/PG-Liposomen mit einem Cholesterolanteil von 0 bzw. 30 % werden die nach 24 h registrierten Spektren von einem Drei-Linien-Signal dominiert. Dagegen werden die Spektren von CAT-1 nach der Applikation in DOPC/CH/PG-Liposomen mit einem Cholesterolanteil von 50 % bzw. allen Formulierungen aus DPPC/CH/PG bereits nach sieben Stunden von einem breiten Singulett dominiert.

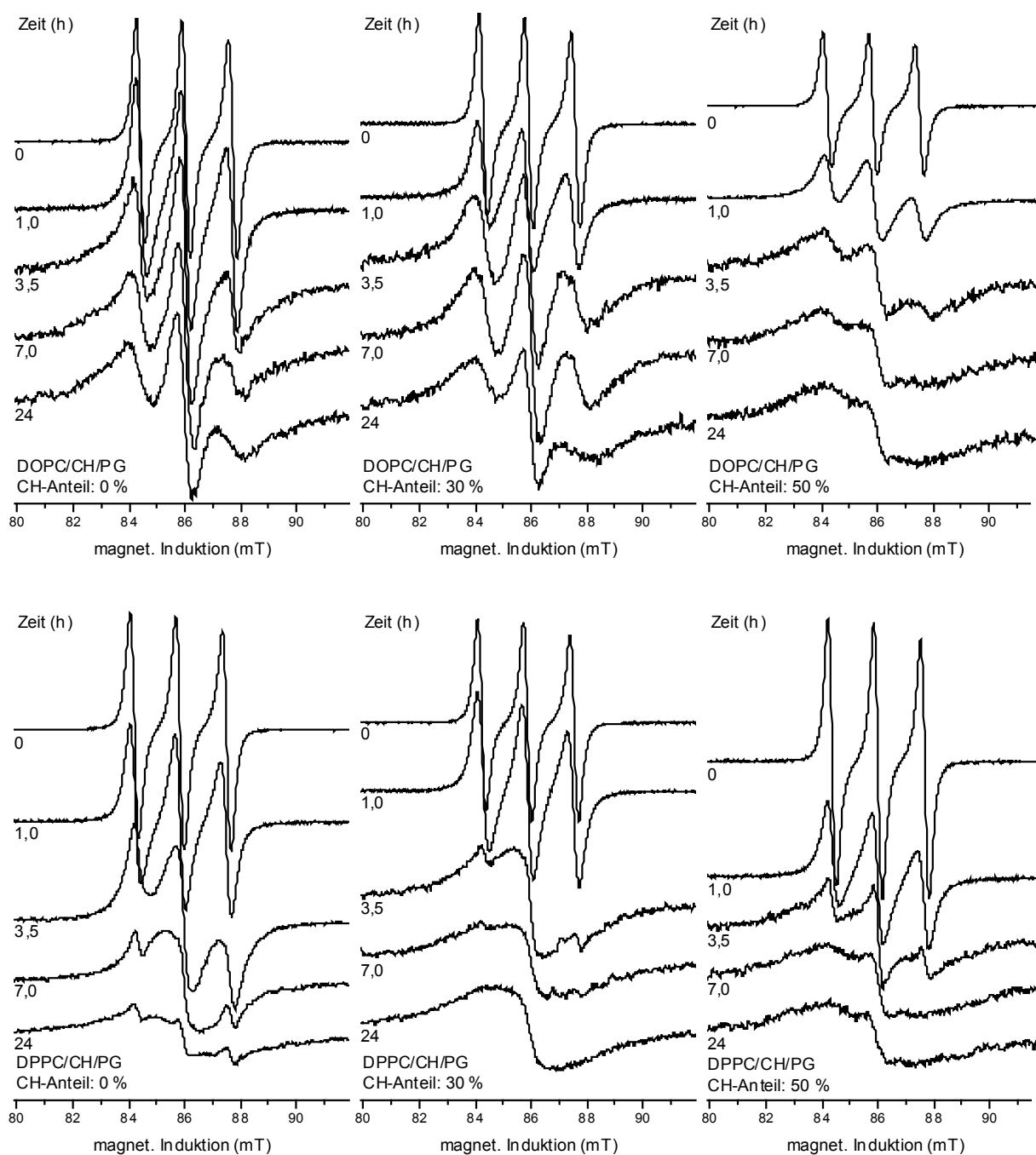


Abb. 83 ESR-Spektren der Spinsonde CAT-1 in Liposomenzubereitungen mit den Grundlagen DOPC/CH/PG bzw. DPPC/CH/PG in Abhängigkeit von der Zeit (h) nach Applikation auf exzidierte Epidermis

Mit Hilfe des PEST-Programms wurden die Parameter der Einzelspektren ermittelt und deren Anteil am Gesamtspektrum in Abb. 84 dargestellt.

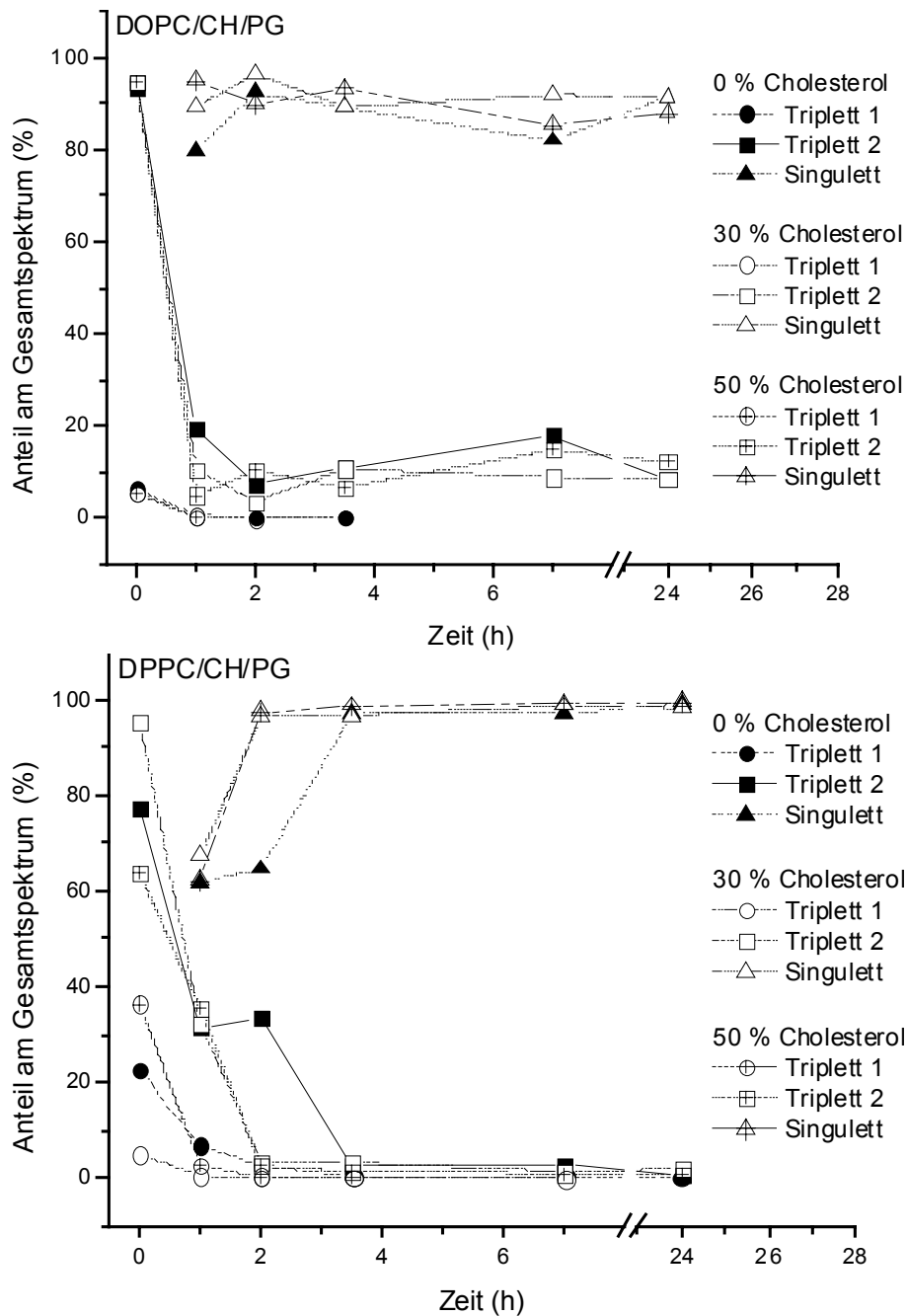


Abb. 84 Integrale Anteile der Einzelkomponenten (Triplet 1, Triplet 2 bzw. Singulett) am Gesamtspektrum der Spinsonde CAT-1 in Liposomenzubereitungen mit den Lipidgrundlagen DOPC/CH/PG bzw. DPPC/CH/PG und variierendem Cholesterolgehalt in Abhängigkeit von der Zeit nach Applikation auf exzidierte Epidermis

Danach bestehen die aufgezeichneten Spektren aus der Überlagerung von zwei bzw. drei Einzelspektren. Während die unmittelbar nach dem Start aufgezeichneten Spektren aus einem Triplet mit schmalen Einzellinien (Triplet 1) und einem Triplet mit breiten Einzellinien (Triplet 2) bestehen, muss zur Anpassung der Simulation an die nach einer Stunde registrier-

ten Spektren ein Singulett als dritte Einzelkomponente des Gesamtspektrums berücksichtigt werden.

Die Linienbreiten des Triplett 1 entsprechen etwa den Linienbreiten der Spinsonde in den Ausgangsformulierungen ($\sim 0,12 - 0,15$ mT). Diese Spezies kann daher Bereichen zugeordnet werden, in denen die ursprüngliche Konzentration der Spinsonde erhalten bleibt und die applizierte Formulierung vor einem Wasserverlust geschützt ist. Während der Anteil des Triplett 1 nach dem Start der Untersuchung besonders in Formulierungen mit der Grundlage DPPC/CH/PG relativ hoch war (max. 36,4 %), nahm der Anteil innerhalb von einer Stunde auf unter 1 % ab. Geringe Anteile dieser Spezies, die auch nach sieben bzw. 24 h in den Spektren der DPPC/CH/PG-Zubereitung detektiert werden konnten, befanden sich an Orten, an denen genügend Wasser zur Solvatisierung der Spinsonden zur Verfügung stand.

Die Linienbreiten des Triplett 2 sind im Gegensatz zu den Linienbreiten des Triplett 1 bereits unmittelbar nach der Applikation im Vergleich zu den ursprünglichen Zubereitungen deutlich erhöht ($\sim 0,23 - 0,28$ mT). Dieses kann durch eine Wasseraufnahme des Stratum corneum bzw. den Wasserverlust aus den applizierten Formulierungen und den dadurch bedingten Anstieg der Konzentration von CAT-1 in den Formulierungen begründet werden, in deren Folge die Wechselwirkungen zwischen den Spinsondenmolekülen zunehmen. Das Triplett 2 repräsentiert in der Untersuchung einen Spinsondenanteil, der mobil ist und sich in einem Teil der Zubereitung befindet, dem kontinuierlich Wasser entzogen wird, was zu einem Anstieg der Linienbreiten des Triplett 2 im Verlauf der Untersuchung führt (vgl. 3.2.2).

In den unmittelbar nach dem Start aufgezeichneten Spektren ist das Triplett 2 mit einem Anteil von ca. 63 – 95 % am Gesamtspektrum die Hauptkomponente. Ihr Anteil nahm im weiteren Verlauf der Untersuchung in Abhängigkeit von der ausgewählten Zubereitung bzw. deren Membranviskosität ab. In Formulierungen mit DOPC/CH/PG-Liposomen, deren Lipidmembranen fluide sind und eine geringe Membranviskosität aufweisen (vgl. 3.1.2.2), verringerte sich der Anteil des Triplett 2 innerhalb von einer Stunde auf ca. 10 %. Im weiteren Verlauf der Untersuchung erreichte der Anteil dieser Komponente am Gesamtspektrum von DOPC/CH/PG-formulierungen einen stationären Zustand. In Formulierungen mit DPPC/CH/PG-Liposomen, deren Membranen rigide sind und eine hohe Membranviskosität aufweisen, nahm der Anteil des Triplett 2 am Gesamtspektrum im Vergleich zu Formulierungen mit DOPC/CH/PG-Liposomen langsamer ab. Eine Stunde nach der Applikation der

Zubereitung lag der Anteil des Triplett 2 noch bei ca. 33 %. Diese Unterschiede zwischen den Formulierungen sind wahrscheinlich auf ein unterschiedlich stark ausgeprägtes Vermögen zur Retention von Wasser in der Formulierung bzw. auf die unterschiedliche Einbindung der Spinsonden in den auf der Haut entstehenden Lipidfilm zurückzuführen. Während DOPC/CH/PG-Liposomen auf der Haut schnell ihre Integrität verlieren, sind DPPC/CH/PG-Liposomen im Vergleich dazu stabiler und geben verkapselt vorliegende Spinsonden langsamer an ihre Umgebung ab (vgl. 3.2.1). Gleichzeitig wird durch den erhöhten Kristallisationsgrad der Lipidmembranen von DPPC/CH/PG-Liposomen wahrscheinlich der Wasserverlust aus dem Inneren der Vesikel vermindert, wodurch der erhöhte Anteil des Triplett 2 am Gesamtspektrum nach einer Stunde erklärt werden könnte.

Die dritte Einzelkomponente der aufgezeichneten ESR-Spektren ist ein Singulett, das zur Anpassung der Simulation an die nach einer Stunde aufgezeichneten Spektren berechnet werden muss. Die Zunahme der Linienbreiten der Singulett-Komponenten verlief in diesem Versuch ähnlich wie in den unter 3.2.2 durchgeführten Untersuchungen. Während für das Singulett zunächst Linienbreiten im Bereich von 1,2 – 1,7 mT bestimmt wurden, nahmen diese im weiteren Verlauf rasch zu und stiegen auf mehr als 3,0 mT an. In den unter 3.2.2 durchgeführten Versuchen an Lösungen konnte gezeigt werden, dass es mit steigendem Wasserverlust aus der Zubereitung zunächst zu einer starken Konzentrationszunahme der Spinsonde kommt, in deren Folge die Linienbreiten durch Spinaustausch abnehmen. Reicht der Wassergehalt der Zubereitung nicht mehr aus, um die Spinsonde zu solvatisieren, kristallisiert diese an der Hautoberfläche aus, woraufhin die Linienbreiten des Singulett stark ansteigen. Die Anteile der Singulett-Komponenten an den registrierten Gesamtspektren der Zubereitungen aus der Lipidgrundlage DOPC/CH/PG erreichten bereits nach einer Stunde einen Wert von ca. 90 % und veränderten sich im weiteren Verlauf der Untersuchung nicht mehr. Da der Wasserverlust aus den Zubereitungen mit der Lipidgrundlage DPPC/CH/PG verzögert war nahm auch der Anteil der Singulett-Komponente langsamer zu. Nach 3,5 h betrug der Anteil der Singulett-Komponente am Gesamtspektrum von CAT-1 in allen Zubereitungen aus DPPC/CH/PG mehr als 96 %. Dadurch wird deutlich, dass in Zubereitungen aus DPPC/CH/PG ein höherer Anteil der Spinsonde in Form von Kristallen auf der Hautoberfläche vorlag als in vergleichbaren Zubereitungen aus der Grundlage DOPC/CH/PG. Dies könnte ebenfalls auf den erhöhten Kristallisationsgrad der Lipidmembranen von DPPC/CH/PG-Liposomen und die dadurch bedingte molekulardisperse Einbindung der

Spinsonde in dem entstehenden Lipidfilm zurückzuführen sein.

Anhand der Simulationen der Triplett-2-Komponente wurde die Rotationskorrelationszeit der Spinsonde in Abhängigkeit von der Lipidgrundlage und der Zeit nach der epikutanen Applikation der Zubereitung bestimmt (Abb. 85). Anschließend wurde die Mikroviskosität der Spinsonden-Umgebung auf dem Stratum corneum berechnet. Dazu wurden die Rotationskorrelationszeiten von CAT-1 mit Hilfe einer Kalibriergeraden (vgl. 5.3.12) in die entsprechenden Mikroviskositäten überführt (Abb. 86).

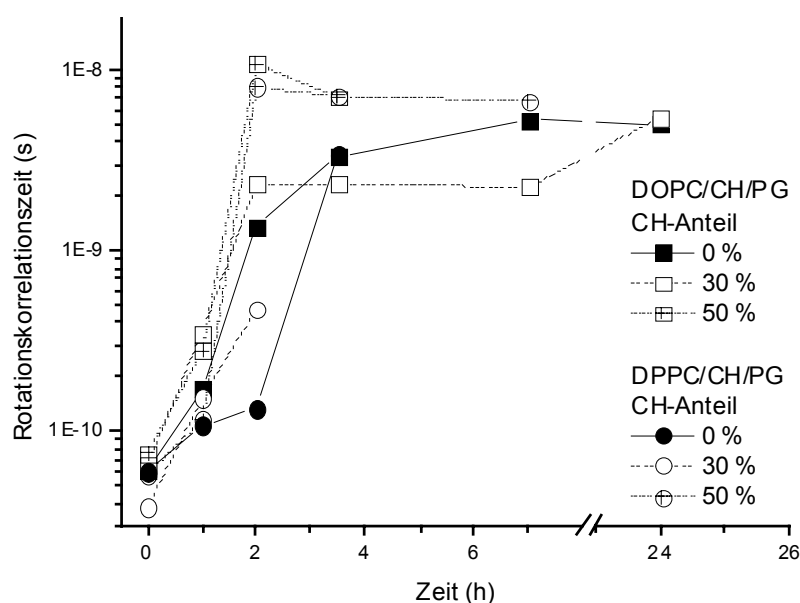


Abb. 85 Abhängigkeit der Rotationskorrelationszeit der Spinsonde CAT-1 in Liposomenzubereitungen mit den Lipidgrundlagen DOPC/CH/PG bzw. DPPC/CH/PG und variierendem Cholesterolgehalt in Abhängigkeit von der Zeit nach Applikation auf exzidierte Epidermis

Die Rotationskorrelationszeiten von CAT-1 befanden sich zum Startzeitpunkt in einem Bereich von $3,75 \cdot 10^{-11}$ bis $7,59 \cdot 10^{-11}$ Sekunden und lagen damit im Bereich der Rotationskorrelationszeiten, die für CAT-1 in Wasser ($2,86 \cdot 10^{-11}$ s) bzw. einer niedrig-viskosen Glycerin-Wasser-Mischung ($7,90 \cdot 10^{-11}$ s) bestimmt wurden. Dies entspricht einem Viskositätsbereich von 0 bis 3 mPa·s.

Innerhalb der ersten 3,5 Stunden der Untersuchung nahmen die Rotationskorrelationszeiten stark zu und unterlagen danach nur noch geringen Schwankungen. Die Viskositäten der Zubereitung aus DOPC/CH/PG stiegen innerhalb dieses Zeitraumes in Abhängigkeit vom Cholesterolgehalt der Formulierung auf Werte zwischen 132 und 1075 mPa·s an. Die

Bestimmung der Korrelationszeit für Zubereitungen aus DPPC/CH/PG konnte aufgrund des geringen Anteils des Triplett 2 am Gesamtspektrum und den sich daraus ergebenden Ungenauigkeiten der Simulation nicht für alle Zeitpunkte bestimmt werden. In den ersten zwei Stunden nach der Applikation der Zubereitung auf die Haut waren die Korrelationszeiten von CAT-1 in diesen Zubereitungen jedoch geringer als in den entsprechenden Formulierungen aus DOPC/CH/PG. Die entsprechenden Viskositäten der DPPC/CH/PG-Zubereitungen lagen in einem Bereich von 9 bis 799 mPa·s. Anhand des Spinsodenexperiments wird dadurch die oben geäußerte Vermutung bestätigt, dass Liposomen mit rigiden Lipidmembranen zu einem langsameren Wasserverlust aus der applizierten Zubereitung führen als Liposomen mit fluiden Lipidmembranen.

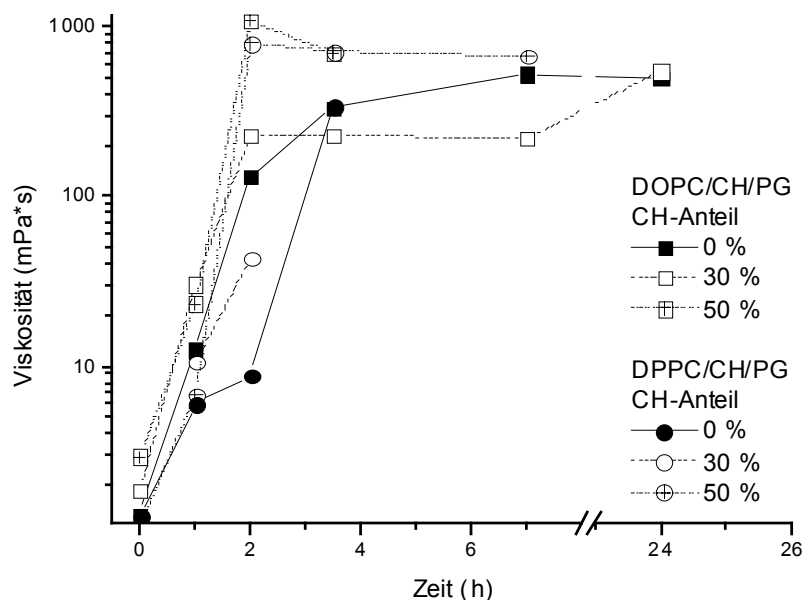


Abb. 86 Abhängigkeit der Umgebungsviskosität der Spinsonde CAT-1 in Liposomenzubereitungen mit den Lipidgrundlagen DOPC/CH/PG bzw. DPPC/CH/PG und variierendem Cholesterolgehalt in Abhängigkeit von der Zeit nach Applikation auf exzidierte Epidermis

Aus Abb. 85 geht hervor, dass die Rotationskorrelationszeiten und damit die Viskositäten der Zubereitungen mit einem Cholesterolgehalt von 50 % sehr schnell anstiegen und deutlich über den Werten der anderen Zubereitungen lagen. Cholesterol scheint daher für die Immobilisierung und Fixierung der Spinsonde auf der Haut von besonderer Bedeutung zu sein.

Mit den durchgeführten Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass der Hauptanteil der Spinsonde CAT-1 nach der Applikation von liposomalen Zubereitungen auf exzidierte humane Epidermis mit zunehmendem Wasserverlust aus der Zubereitung kristallisiert, und

nur ein geringer Anteil molekulardispers verteilt und beweglich vorliegt. Die Solubilisierung von CAT-1 durch Wasser aus der Haut ist daher wahrscheinlich einer der geschwindigkeitsbestimmenden Schritte für die Penetration der Spinsonde in die Haut. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Mobilität von CAT-1 nach der epikutanen nicht okklusiven Applikation stark abnimmt, während gleichzeitig die Viskosität der Mikroumgebung stark ansteigt.

3.3.2 Mobilität von 5-Doxylpalmitinsäure in der Membran von Liposomen vor und nach epikutaner Applikation

Nachdem unter 3.3.1 die Mobilität der hydrophilen, epikutan applizierten Spinsonde CAT-1 charakterisiert wurde, sollte im nachfolgenden Kapitel die Fluidität der Lipidmembranen von Liposomen vor und nach deren Applikation mit Hilfe der amphiphilen Spinsonde 5-Doxylpalmitinsäure untersucht werden. Dadurch sollte geklärt werden, ob die Mobilität der Membranlipide durch die Applikation und den damit einhergehenden Wasserverlust verändert wird, oder ob die Eigenschaften der Phospholipidstrukturen, wie andere Autoren [184] vermuten, erhalten bleiben.

Die Fluidität von Lipidmembranen kann anhand der Ordnungsparameter (S), die das Verhältnis zwischen der beobachteten Hyperfein-Anisotropie und der maximalen Hyperfein-Anisotropie darstellen [255], abgeschätzt werden. Die Abweichung von den maximalen Werten wird umso größer, je stärker die Beweglichkeit der Radikalsonden wird. Entsprechend repräsentieren Ordnungsparameter von $S = 1$ hoch geordnete Systeme, während Ordnungsparameter von $S = 0$ für eine vollständig isotrope Beweglichkeit der Spinlabel stehen. Erhöhungen der Ordnungsparameter spiegeln daher Verminderungen der Flexibilität des Segmentes wieder, in dem sich das Label befindet, wohingegen Verminderungen der Ordnungsparameter Erhöhungen der Flexibilität anzeigen [288].

Die Ordnungsparameter wurden nach der von Griffith und Jost bzw. Hubbell und McConnell [289, 290] eingeführten Methode mit folgender Gleichung berechnet:

$$S = (A_{\parallel} + A_{\perp}) / [A_{zz} - 1/2(A_{xx} + A_{yy})] (a'_o/a_o) \quad (2)$$

Dabei ist $2A_{\parallel}$ die äußere maximale Aufspaltung ($2A_{\max}$, Abb. 87), und $2A_{\perp}$ die innere

minimale Hyperfeinaufspaltung ($2A_{\min}$). Nach Gaffney sollte ein Korrekturfaktor eingeführt werden, wenn kleine Ordnungsparameter erwartet werden, um die mit abnehmendem Ordnungsparameter steigende Abweichung zwischen dem gemessenen und dem wahren Wert von A_{\perp} auszugleichen [291]. Dieser wird mit folgender Gleichung berechnet:

$$A'_{\perp} = A_{\perp(\text{gemessen})} + [1 - (A_{\parallel} - A_{\perp(\text{gemessen})}/A_{zz} - 0,5 (A_{xx} + A_{yy}))] \quad (3)$$

Die Aufspaltungen für den kristallinen Zustand A_{xx} , A_{yy} , A_{zz} werden durch Einstellung des Magnetfeldes B_0 parallel zu den entsprechenden magnetischen Achsen bestimmt.

Der Term (a'/a_0) ist ein Korrekturfaktor, der die Möglichkeit ausgleicht, dass die Polarität in der zu untersuchenden Probe von der des Einkristalls abweicht, mit dem die Aufspaltungen A_{xx} , A_{yy} , A_{zz} bestimmt wurden. Dabei bezeichnet a'_0 die isotrope Hyperfeinkopplungskonstante der Nitroxide im kristallinen Zustand und wird berechnet nach:

$$a'_0 = 1/3 (A_{xx} + A_{yy} + A_{zz}) \quad (4)$$

Die Werte, die zur Beschreibung der anisotropen Bewegung von 5-Doxylpalmitat in Membranen verwendet wurden, sind:

$$A_{xx}; A_{yy}; A_{zz} = 0,61; 0,61; 3,24 \text{ mT} \quad (5)$$

Dagegen wird die isotrope Hyperfeinkopplungskonstante für das Spinlabel in den untersuchten Membranen (a_0) berechnet nach:

$$a_0 = 1/3 (A_{\parallel} + 2A_{\perp}) \quad (6)$$

Die Werte von a_0 sind abhängig von der Umgebungspolarität des Spinlabels, da Wasserstoffbrückenbindungen zur N-O-Gruppe die Hyperfeinaufspaltung A_{zz} erhöhen [vgl. 292]. Die Zunahme der Umgebungspolarität der Spinsonde hat steigende a_0 -Werte zur Folge [293].

Bei der Diskussion der Ergebnisse ist zu beachten, dass die Eigenschaften der zu untersuchenden Membran durch die Inkorporation des Spinlabels verändert werden und nicht mehr mit der ursprünglichen Membran übereinstimmen [294]. Um die Vergleichbarkeit der erzielten Ergebnisse zu gewährleisten, wurde unter Beachtung des erreichbaren Signal-Rausch-Verhältnisses für alle Formulierungen ein molarer Spinsondenanteil von 5 % gewählt.

Die Membranfluidität von Liposomen wurde nach der Applikation der Formulierungen auf Parafilm untersucht, um eine Veränderung der Spinsondenmobilität durch Lipide des Stratum

corneum zu vermeiden.

Mobilität von 5-Doxylpalmitinsäure in der Membran von Liposomen

Für die durchgeführten Untersuchungen, bei denen die Mobilität der Spinsonden 5-Doxylpalmitinsäure in der Membran von Liposomen bestimmt werden sollte wurden Liposomen aus den Grundlagen DOPC/CH/PG, DPPC/CH/PG, P80/CH und P80H/CH mit variierendem Cholesterolanteil in den Lipiddoppelmembranen hergestellt. Während DOPC/CH/PG- bzw. P80-Liposomen fluide Membranen aufweisen (vgl. 3.1.2.2), besitzen Vesikel aus DPPC/CH/PG bzw. P80H/CH rigide Lipiddoppelmembranen. Die unterschiedliche Membranfluidität hat einen deutlichen Einfluss auf die Mobilität der Spinsonde 5-Doxylpalmitinsäure, die in die Membranen der Liposomen inkorporiert wurde. Nach der Inkorporation in Liposomen mit fluiden Lipidmembranen werden anisotrope ESR-Spektren aufgezeichnet, aus denen die äußere maximale (A_{\max}) und innere minimale Aufspaltung (A_{\min}) der Spinsonde eindeutig bestimmt werden kann (Abb. 87). Befindet sich die Sonde in Liposomen mit rigiden Membranen, kann dagegen nur die äußere maximale Aufspaltung eindeutig für alle Zubereitungen bestimmt werden, während die innere minimale Aufspaltung erst ab einem Cholesterolgehalt der Membranen von mehr als 10 % ausgewertet werden kann. Die ESR-Spektren der Spinsonde in Liposomen mit rigiden Membranen weisen einen weiteren Unterschied zu den ESR-Spektren der Spinsonde in Liposomen mit fluiden Membranen auf. Die ebenfalls anisotropen Spektren werden von einem zweiten ESR-Spektrum überlagert, dessen Signalform auf eine hohe isotrope Beweglichkeit der Spinsonde schließen lässt. Die Aufspaltung dieses Spektrums ($aN = 1,47 \text{ mT}$) unterscheidet sich nicht von der Aufspaltung der Spinsonde in Phosphatpuffer, der hier als Dispersionsmedium verwendet wurde. Daher kann davon ausgegangen werden, dass ein Teil der Spinsonde aufgrund des hohen Ordnungsgrades der Liposomenmembranen aus Phospholipiden mit gesättigten Fettsäureresten nicht in diese inkorporiert wird, sondern in Form von Mizellen im wässrigen Dispersionsmedium vorliegt. Diese Annahme wird durch die von Vrhovnik et al. [295] durchgeführten Untersuchungen unterstützt. Die Autoren konnten weiterhin anhand von DMPC-Liposomen zeigen, dass ein zunehmender Cholesterolanteil zur Ausbildung von Domänen in der Liposomenmembran führt, deren Flexibilität sich von der übrigen Membran unterscheidet. Die Ausbildung von Mikrodomänen durch Cholesterol wurde auch

von Slotte [296] nachgewiesen. In den vorliegenden Untersuchungen wurde aufgrund der Spektrenqualität auf eine Differenzierung in bezug auf Domänen verzichtet und das Gesamtsystem anhand der Aufspaltungswerte A_{\max} und A_{\min} beschrieben. Aus den Aufspaltungswerten A_{\max} und A_{\min} wurden die polaritätsabhängigen a_0 -Werte sowie die Ordnungsparameter der Spinsonde berechnet (Tab. 8).

Die Auswertung der minimalen und maximalen Aufspaltung von 5-Doxylpalmitinsäure belegt den Effekt von Cholesterol auf die Membranen von Liposomen aus nicht hydrierten bzw. hydrierten Phospholipiden.

In Liposomenmembranen aus nicht hydrierten Phospholipiden führt Cholesterol zu einer dichteren Packung der Membranlipide, die durch die Verminderung der Ausdehnung der einzelnen Phospholipidmoleküle hervorgerufen wird [233]. In der Folge dieses kondensierenden Effektes sinkt die Flexibilität der Membranen. In den korrespondierenden ESR-Spektren führt dies zu einem Anstieg der maximalen Aufspaltung und zu einer Abnahme der minimalen Aufspaltung der Spinsonde. Die aus den Aufspaltungen berechneten Ordnungsparameter von 5-Doxylpalmitinsäure in den untersuchten DOPC/CH/PG- bzw. P80/CH-Liposomen nehmen mit steigendem Cholesterolanteil der Membranen von 0,56 auf 0,66 zu. Da die Ordnungsparameter ein direktes Maß für die Mobilität der Spinsonde und der sie umgebenden Membranlipide sind, kann auf die mit steigendem Cholesterolgehalt zunehmende Rigidity der Lipidmembranen geschlossen werden [297]. Durchgeführte Regressionsanalysen (nicht abgebildet), mit der Einflussgröße P_{DPH} bzw. $P_{\text{DPH-TMA}}$ und S als Zielgröße, bestätigen die Korrelation zwischen den Polarisationsindizes der Fluoreszenzmarker DPH bzw. DPH-TMA als Maß für die Membranrigidity der Liposomen (vgl. 3.1.2.2.) und den Ordnungsparametern der Spinsonde 5-Doxylpalmitinsäure ($R = 0,921 - 0,985$).

Durch den steigenden Cholesterolanteil wird nicht nur der Ordnungsgrad und die Membranrigidity verändert, sondern auch die Polarität der Spinsondenumgebung erhöht, wodurch der Wert von a_0 ansteigt. Dieses Ergebnis kann durch die mit zunehmendem Cholesterolgehalt ansteigende Packungsdichte der Phospholipide und die damit ansteigenden Wechselwirkungen zwischen den polaren Kopfgruppen der Phospholipide und dem Spinlabel erklärt werden.

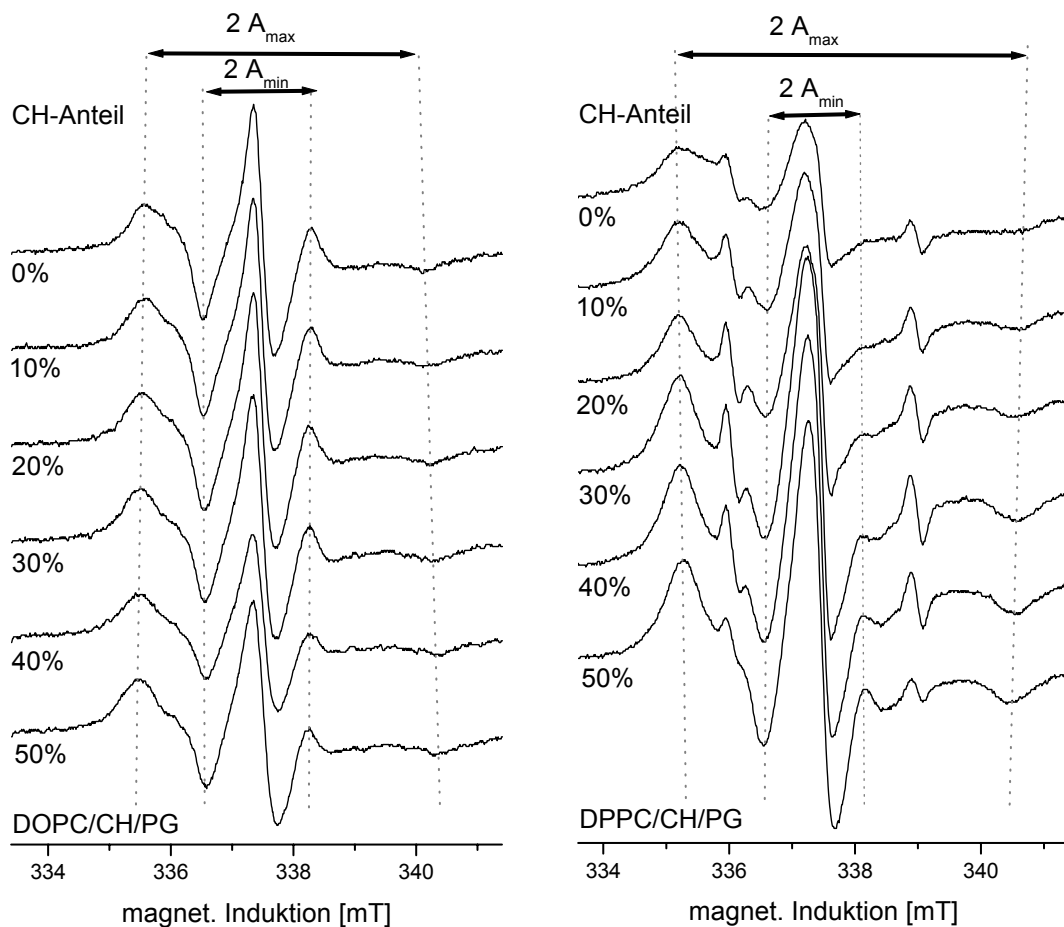


Abb. 87 ESR-Spektren der Spinsonde 5-Doxylpalmitat in Liposomenzubereitungen mit den Lipidgrundlagen DOPC/CH/PG bzw. DPPC/CH/PG und variierendem Cholesterolgehalt der Lipidmembranen.

Im Gegensatz zu Lipidmembranen aus nicht hydrierten Phospholipiden führt Cholesterol in Lipidmembranen aus hydrierten Phospholipiden zu einer Auflockerung der dicht gepackten Membranen. Durch den Einbau des unregelmäßig geformten Cholesterols werden die Phospholipide auseinander gedrückt. Die verminderte Packungsdichte der Phospholipidketten reduziert die Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Molekülen, wodurch größere sterische Freiheitsgrade möglich werden und die Fluidisierung der gesamten Membran hervorgerufen wird [233]. Die erhöhte Flexibilität der Membranen führt ebenfalls zu einer erhöhten Mobilität der inkorporierten Spinsonde, deren Ordnungsparameter in Liposomen mit steigendem Cholesterolgehalt abnehmen. Während A_{\max} ebenfalls vermindert wird, nimmt der Wert von A_{\min} zu.

Mit Hilfe von Regressionsanalysen mit der Einflussgröße P_{DPH} bzw. $P_{\text{DPH-TMA}}$ und S als

Zielgröße konnte nur für die Kombination $P_{\text{DPH-TMA}}$ und $S_{\text{DPPC/CH/PG}}$ eine Korrelation nachgewiesen werden ($R = 0,971$). Die Ordnungsparameter der Spinsonde in den übrigen Liposomen aus hydrierten Phospholipiden korrelieren nicht mit den Polarisationsindizes der Fluoreszenzmarker DPH und DPH-TMA ($R < 0,591$).

Die Polarität der Spinsonden-Umgebung wurde durch den Einbau von Cholesterol in die Lipidmembran nicht verändert, wodurch sich die Frage nach dem wahrscheinlichen Aufenthaltsort des Spinlabels in der Membran ergibt, da der größere Abstand der einzelnen Phospholipide zueinander vermutlich nicht zu einer Verminderung der Wechselwirkungen zwischen dem Spinlabel und den Kopfgruppen der Phospholipide führt.

Aus den Untersuchungen ergaben sich keine Unterschiede zwischen den Liposomen aus DOPC/CH/PG und P80/CH bzw. DPPC/CH/PG und P80H/CH. Die Ordnungsparameter und Polaritäten der Liposomen aus nicht hydrierten und hydrierten Phospholipiden unterschieden sich dagegen deutlich voneinander.

Die Ordnungsparameter der Spinsonde in Liposomen aus hydrierten Phospholipiden weisen aufgrund der größeren Packungsdichte und dem daraus resultierenden höheren Ordnungsgrad größere Werte auf, als die Ordnungsparameter der Spinsonde in Liposomen aus ungesättigten Phospholipiden. Durch den Einbau von Cholesterol in die Lipidmembranen kommt es zu einer Erhöhung bzw. Verminderung der Flexibilität der Membranen, wodurch der Unterschied zwischen den Ordnungsparametern der Spinsonde in Liposomen mit rigiden bzw. fluiden Membranen deutlich geringer wird.

Die Polarität ist in Liposomen mit rigiden Membranen größer als in Liposomen mit fluiden Membranen und wird im Gegensatz zu diesen durch den Einbau von Cholesterol nicht verändert. Die Ursache dafür könnte darin liegen, dass das Spinlabel an seinem Aufenthaltsort eine höhere Zugänglichkeit für Wassermoleküle aufweist, und daher weniger durch die Polarität der Membran als vielmehr durch die Polarität des umgebenden Dispersionsmediums geprägt wird. Ein Vergleich der a_o -Werte der Spinsonde in der Membran (1,37-1,45 mT) und in Phosphatpuffer (1,46 mT) unterstützt diese Vermutung. Weiterhin sollte in Betracht gezogen werden, dass auch die Einbindung der Spinsonde in rigiden Membranen im Vergleich zu fluiden Membranen verändert sein könnte. Hinweise für eine Verschiebung in Richtung des Dispersionsmediums finden sich in den Untersuchungen von Griffith et al. [290] zur Wasserpenetration in Lipiddoppelmembranen.

Tabelle 8 Maximale (A_{\max}) und minimale Aufspaltung (A_{\min}), Polarität bzw. isotrope Hyperfeinkopplungskonstante (a_0) und Ordnungsparameter S der Spinsonde 5-Doxylpalmitinsäure in Liposomen mit verschiedenen Lipidgrundlagen ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Lipid	CH-Anteil (mol %)	A_{\max} (mT)	A_{\min} (mT)	a_0 (mT)	S
DOPC/CH/PG	0	2,29±0,02	0,89±0,01	1,36±0,00	0,58±0,01
	10	2,31±0,03	0,88±0,01	1,36±0,01	0,60±0,01
	20	2,35±0,01	0,86±0,00	1,36±0,00	0,62±0,01
	30	2,42±0,02	0,85±0,01	1,38±0,00	0,64±0,01
	40	2,46±0,02	0,84±0,00	1,38±0,00	0,66±0,01
	50	2,46±0,01	0,84±0,01	1,38±0,01	0,66±0,00
DPPC/CH/PG	0	2,77±0,02	0,69±0,12	1,38±0,08	0,85±0,09
	10	2,73±0,02	0,77±0,04	1,42±0,03	0,78±0,02
	20	2,72±0,02	0,76±0,01	1,41±0,00	0,78±0,01
	30	2,71±0,01	0,77±0,01	1,42±0,01	0,77±0,01
	40	2,67±0,02	0,80±0,01	1,42±0,01	0,74±0,01
	50	2,61±0,01	0,82±0,01	1,42±0,01	0,72±0,00
P80/CH	0	2,25±0,05	0,91±0,00	1,36±0,02	0,56±0,01
	10	2,29±0,01	0,89±0,00	1,36±0,00	0,59±0,00
	20	2,34±0,02	0,87±0,01	1,36±0,01	0,61±0,01
	30	2,39±0,03	0,85±0,00	1,37±0,01	0,64±0,01
	40	2,42±0,01	0,86±0,01	1,38±0,01	0,64±0,01
	50	2,45±0,00	0,84±0,00	1,38±0,00	0,66±0,00
P80H/CH	0	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
	10	2,82±0,01	0,65±0,06	1,37±0,05	0,90±0,05
	20	2,76±0,04	0,72±0,10	1,40±0,05	0,83±0,08
	30	2,69±0,09	0,81±0,02	1,44±0,02	0,74±0,03
	40	2,66±0,06	0,84±0,01	1,45±0,02	0,71±0,01
	50	2,58±0,02	0,84±0,02	1,42±0,01	0,69±0,02

Mobilität von 5-Doxylpalmitinsäure in der Membran von Liposomen nach Applikation auf Parafilm

Mit den folgenden Untersuchungen sollte die Mobilität von 5-Doxylpalmitinsäure in der Membran von Liposomen nach deren Applikation bestimmt werden. Dazu wurden Liposomen aus den Lipidgrundlagen DOPC/CH/PG, DPPC/CH/PG, P80/CH bzw. P80H/CH, deren Membranen die Spinsonde 5-Doxylpalmitinsäure (5 mol%) und einen Cholesterolanteil von 0, 30 bzw. 50 mol% enthielten, auf Parafilm appliziert. Die Proben wurden anschließend bei 44 % rel. F. und 32 °C inkubiert. Nach 1,0; 3,5 und 7,0 h wurden ESR-Spektren von den Proben aufgezeichnet und die minimale sowie maximale Aufspaltung der Spinsonde

bestimmt. Nach den Gleichungen 2 und 6 wurden die Ordnungsparameter und die isotrope Aufspaltung a_0 als Maß für die Polarität berechnet.

Innerhalb der ersten Stunde nach der Applikation der Zubereitung bildet sich auf der Oberfläche des Parafilms ein Lipidfilm aus. Die ESR-Spektren von 5-Doxylpalmitinsäure in den Membranen von DOPC/CH/PG- bzw. P80/CH-Liposomen sind anisotrop und belegen die eingeschränkte Beweglichkeit der Spinsonde (Abb. 88). Im Vergleich zu den Liposomen im Dispersionsmedium ist die Beweglichkeit der Spinsonde in den applizierten Liposomen vermindert. Dieses wird dadurch deutlich, dass der Hochfeldpeak, der zur Bestimmung der inneren minimalen Aufspaltung (A_{\min} bzw. A_{\perp}) herangezogen wird (Abb. 88, Pfeil), unterhalb der Basislinie der aufgezeichneten ESR-Spektren liegt und mit steigendem Cholesterolgehalt in den Liposomenmembranen zunehmend vom Minimum des Mittelfeldpeaks überlagert wird.

Die ESR-Spektren der Spinsonde in den applizierten Zubereitungen mit den Lipidgrundlagen DPPC/CH/PG und P80H/CH sind ebenfalls anisotrop. Sie werden nicht mehr von einem isotropen Spektrum mit geringen Linienbreiten überlagert, das in den Spektren der Ausgangsformulierungen die Existenz von Spinsondenmizellen neben den Liposomen anzeigte. Es ist anzunehmen, dass diese Mizellen durch den zunehmenden Wasserverlust aus der Zubereitung destabilisiert und ihre Bestandteile in die Lipidmembran der Vesikel integriert bzw. auf der Oberfläche der Lipidmembranen immobilisiert werden.

In den ESR-Spektren der Zubereitungen aus DPPC/CH/PG mit einem Cholesterolanteil von 30 bzw. 50 % kann der zur Bestimmung der inneren Aufspaltung notwendige Hochfeldpeak nur unzureichend vom Minimum des Mittelfeldpeaks unterschieden werden. Ähnlich wie in den Zubereitungen mit DOPC/CH/PG- bzw. P80-Liposomen kann daraus auf die Zunahme des Immobilisierungsgrades der Spinsonde im Vergleich zu den Ausgangsformulierungen geschlossen werden.

Die ESR-Spektren von 5-Doxylpalmitinsäure in Zubereitungen aus DPPC/CH/PG mit einem CH-Anteil von 0 % bzw. aus P80H/CH mit einem CH-Anteil von 0 bzw. 50 % werden von einem breiten Singulett überlagert, wodurch die Aufspaltungen A_{\max} und A_{\min} nicht mehr bestimmt werden können. Dieses breite Singulett geht auf Spinsonden zurück, die unmittelbar benachbart sind, und zwischen denen verstärkt Spin-Spin-Wechselwirkungen auftreten. Es ist anzunehmen, dass die Spinsonden, die eine Störung der Struktur innerhalb der Lipidmembra-

nen verursachen, mit zunehmendem Wasserverlust aus den Membranen verdrängt werden, um einen geordneten Membranaufbau zu ermöglichen. In der Folge lagert sich die Spinsonde in Mikrodomänen ab, in denen der Spin-Spin-Austausch^d zwischen den Radikalen effektiv wird.

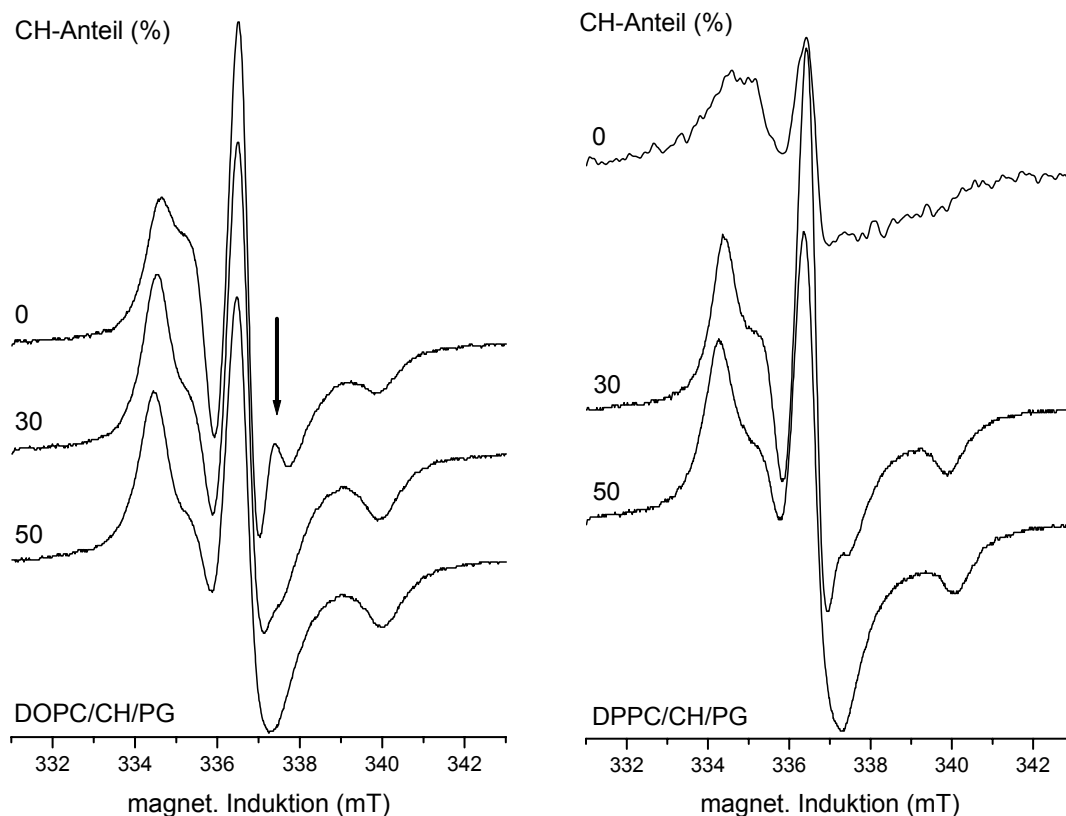


Abb. 88 X-Band ESR-Spektren der Spinsonde 5-Doxylpalmitat in der Membran von Liposomen mit der Lipidgrundlage DOPC/CH/PG bzw. DPPC/CH/PG und variierendem Cholesterolgehalt 60 min, nach der Applikation auf Parafilm

Der Grund für das Auftreten dieses Effektes in Zubereitungen aus P80H/CH bei einem Cholesterolgehalt von 0 bzw. 50 %, jedoch nicht bei einem Cholesterolgehalt von 30 %, bleibt unklar.

Die Auswertung der Hyperfeinaufspaltungen zeigte, dass in Zubereitungen aus Liposomen mit fluiden Membranen, also DOPC/CH/PG bzw. P80/CH, die Werte für die äußere maximale Aufspaltung (A_{\max}) mit steigendem Cholesterolgehalt zunehmen (Tab. 9). Dadurch

^d Der Spin-Spin-Austausch kann mit einem Simulationsprogramms [49] berechnet werden (s. 3.2.2), das zum Zeitpunkt der Auswertung der vorliegenden Ergebnisse jedoch noch nicht verfügbar war.

wird bestätigt, dass der kondensierende Effekt von Cholesterol (s.o.) auch nach der Applikation der Zubereitung erhalten bleibt. Eine gleichzeitige Abnahme der inneren minimalen Aufspaltungen (A_{\min}) wie in den Ausgangszubereitungen konnte nicht mit Sicherheit festgestellt werden und ist eventuell auf die fehlende Möglichkeit zur Unterscheidung des Hochfeldpeaks der minimalen Aufspaltung vom Minimum des Mittelfeldpeaks zurückzuführen. In der Folge fällt die Zunahme der Ordnungsparameter (S) mit steigendem Cholesterolgehalt gering aus. Insgesamt belegen die Werte A_{\max} und S bzw. A_{\min} , die größer bzw. kleiner sind als in den Ausgangsformulierungen, die Abnahme der Membranflexibilität der Liposomen nach deren Applikation.

Die Berechnung der isotropen Aufspaltung a_0 als Maß für die Polarität der Spinsondenumgebung zeigt, dass diese mit steigendem Cholesterolanteil der Membranen zunimmt. Der Polaritätsanstieg fällt größer aus als in den nicht applizierten Zubereitungen. Die Zunahme der Polarität wurde auf die mit steigendem Cholesterolanteil abnehmenden Abstände und die daraus resultierenden stärkeren Wechselwirkungen zwischen den Phospholipiden und Spinsonden zurückgeführt. Die gleichzeitige Abnahme der Flexibilität der Membranen stützt die Vermutung, dass es nach der Applikation der Zubereitung zu einer weiteren Verminderung dieser Abstände kommt, in deren Folge die Polarität der Spinsondenumgebung weiter zunimmt.

Für die Formulierungen mit den Lipidgrundlagen DPPC/CH/PG bzw. P80H/CH lassen sich aufgrund der fehlenden Daten (s. Tab. 9) nur geringe Aussagen zur Veränderung von A_{\max} , A_{\min} , S und a_0 nach der Applikation der Zubereitung machen.

Im Vergleich zu den Ausgangsformulierungen sind A_{\max} und S wie in den Formulierungen aus DOPC/CH/PG und P80/CH größer und belegen die Abnahme der Membranflexibilität nach der Applikation der Liposomen. Der fluidisierende Effekt von Cholesterol konnte für die Membranen der Liposomen auf dem Parafilm im Gegensatz zu den Ausgangszubereitungen nicht nachgewiesen werden. Die Polarität der Spinsondenumgebung wird durch die Applikation wahrscheinlich nicht verändert.

Eine Veränderung der Parameter in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer der Proben konnte für keine der untersuchten Zubereitungen festgestellt werden. Die Ausbildung des Lipidfilms scheint daher bereits nach einer Stunde abgeschlossen zu sein.

Tabelle. 9 Maximale (A_{\max}) und minimale Aufspaltung (A_{\min}), Polarität bzw. isotrope Hyperfeinkopplungskonstante (a_0) und Ordnungsparameter S der Spinsonde 5-Doxylpalmitinsäure in Liposomen mit verschiedenen Lipidgrundlagen bzw. Ölsäure nach Applikation auf Parafilm ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Lipid	CH-Anteil (mol %)	Zeit (h)	A_{\max} (mT)	A_{\min} (mT)	a_0 (mT)	S
DOPC/CH/PG	0	1,0	2,64±0,06	0,75±0,02	1,38±0,03	0,78±0,01
		3,5	2,63±0,09	0,75±0,01	1,37±0,02	0,77±0,03
		7,0	2,62±0,05	0,75±0,01	1,37±0,02	0,77±0,01
	30	1,0	2,74±0,04	0,77±0,03	1,42±0,01	0,78±0,03
		3,5	2,71±0,07	0,77±0,01	1,42±0,02	0,77±0,02
		7,0	2,72±0,05	0,77±0,03	1,42±0,00	0,78±0,03
	50	1,0	2,81±0,02	0,77±0,03	1,45±0,02	0,80±0,02
		3,5	2,79±0,04	0,74±0,05	1,42±0,05	0,82±0,03
		7,0	2,79±0,05	0,73±0,04	1,42±0,04	0,82±0,02
DPPC/CH/PG	0	1,0	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
		3,5	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
		7,0	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
	30	1,0	2,82±0,11	0,74±0,01	1,43±0,04	0,82±0,01
		3,5	2,97±0,06	0,76±0,01	1,50±0,03	0,83±0,00
		7,0	3,07±0,17	0,79±0,03	1,55±0,08	0,84±0,01
	50	1,0	2,97±0,04	0,77±0,01	1,50±0,01	0,83±0,01
		3,5	2,95±0,01	0,76±0,00	1,49±0,00	0,83±0,00
		7,0	3,07±0,21	0,77±0,03	1,54±0,06	0,84±0,05
P80/CH	0	1,0	2,61±0,12	0,77±0,00	1,38±0,04	0,76±0,02
		3,5	2,63±0,06	0,78±0,01	1,40±0,02	0,75±0,02
		7,0	2,61±0,08	0,78±0,03	1,40±0,05	0,74±0,00
	30	1,0	2,70±0,10	0,77±0,02	1,41±0,02	0,77±0,04
		3,5	2,72±0,06	0,77±0,03	1,42±0,01	0,78±0,04
		7,0	2,73±0,08	0,76±0,03	1,42±0,01	0,78±0,04
	50	1,0	2,82±0,04	0,75±0,03	1,44±0,04	0,81±0,02
		3,5	2,79±0,03	0,74±0,03	1,42±0,03	0,81±0,02
		7,0	2,78±0,10	0,80±0,02	1,46±0,02	0,77±0,04
P80H/CH	0	1,0	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
		3,5	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
		7,0	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
	30	1,0	2,71±0,03	0,78±0,03	1,42±0,01	0,77±0,03
		3,5	2,93±0,03	0,80±0,02	1,51±0,02	0,80±0,01
		7,0	2,95±0,02	0,82±0,02	1,53±0,02	0,79±0,01
	50	1,0	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
		3,5	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
		7,0	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.

Die Aussage einer früheren Arbeit [184], bei der die Abstände der Lipidlamellen von

Liposomen vor und nach der Applikation mit Hilfe der Röntgenkleinwinkelstreuung bestimmt wurden, dass nur der Dispersitätsgrad, nicht aber der kolloidale Zustand der Liposomen Veränderungen unterliegt, konnten nicht bestätigt werden. Die durchgeführten Untersuchungen zeigen vielmehr, dass nach der Applikation der Zubereitungen Veränderungen der Liposomenmembranen in Bezug auf deren Flexibilität und Polarität eintreten. Diese kann an den gegenüber den Ausgangsformulierungen erhöhten Werten der Ordnungsparameter und isotropen Aufspaltung der Spinsonde abgelesen werden. In Zubereitungen mit Liposomen aus gesättigten Phospholipiden wird durch den Wasserverlust aus den Formulierungen zudem eine Veränderung der Zusammensetzung der Phospholipiddoppelschichten der Liposomen hervorgerufen. Dies manifestiert sich in einer gegenüber den Ausgangsformulierungen stark veränderten Spektrenform der Spinsonde 5-Doxylpalmitinsäure.

3.3.3 Mobilität von 5-Doxylpalmitinsäure im Stratum corneum nach epikutaner Applikation von Liposomen

Nachdem in den vorangegangenen Kapiteln die Mobilität von Lipiden der Liposomenmembranen vor und nach der Applikation der Vesikel charakterisiert wurde, sollte nachfolgend der Effekt der Liposomenzubereitungen auf die Mobilität der Lipide im humanen Stratum corneum untersucht werden.

Spinsonden, vor allem 5-, 12- und 16-Doxylstearinsäure und deren Esterderivate, wurden bereits in verschiedenen Arbeiten zur Charakterisierung des Stratum corneum bzw. der Epidermis eingesetzt [62, 298, 299]. Kitagawa et al. [282] zufolge wird 5-Doxylstearinsäure in die Lipidlamellen des Stratum corneum aufgenommen, wohingegen der Methylester in stärker fluiden Regionen eingebaut werden soll, die vom Autor jedoch nicht näher benannt werden. Der Vergleich zwischen Liposomen aus Stratum-corneum-Lipiden und dem Stratum corneum selbst zeigt, dass die Mobilität der verwendeten Spinsonden in den Liposomen erhöht ist. Alonso et al. [299] führen die unterschiedliche Spinsondenmobilität auf die in Liposomen fehlenden Wechselwirkungen zwischen den Stratum-corneum-Lipiden und den Proteinen der Keratinozytenumhüllung zurück. Ein Rückschluss auf das Stratum corneum aus Ergebnissen, die an Liposomen erzielt wurden, ist daher nur unter Vorbehalt möglich.

Intensiv untersucht wurde bereits der Effekt von epikutan applizierten Penetrationsenhancern, besonders von Laurocapram (Azone[®]), auf die Mobilität der Stratum-corneum-Lipide [288, 300 - 302]. Dagegen liegen nur wenige Daten zur Veränderung der Mobilität dieser Lipide durch epikutan applizierte Liposomen vor. In einigen kalorimetrischen Studien konnte gezeigt werden, dass die Behandlung der Haut mit Liposomenformulierungen zu einer erhöhten Enthalpie der Phasenübergänge der Stratum-corneum-Lipide führt [303]. Daneben wurden neue Phasenübergänge festgestellt, die auf die applizierten Lipide zurückgeführt werden [167]. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass diese separate Regionen im Stratum corneum bilden. Die dadurch entstehende Fluidisierung der Stratum-corneum-Barriere bzw. die Ausbildung von Mikrodomänen innerhalb des Stratum corneum bedingt wahrscheinlich die erhöhte Penetration von Substanzen in die Haut, die zusammen mit Liposomen appliziert werden [165]. Diese Vermutung wird auch durch die Befunde von Ogiso et al. [304] unterstützt, die an Liposomen aus Stratum-corneum-Lipiden eine Fluidisierung der Barrierelipide durch Ei-Phosphatidylcholin und eine Verminderung der Fluidität durch hydriertes Sojabohnenphosphatidylcholin festgestellt haben.

Eigene Untersuchungen zur Beeinflussung der Mobilität von Stratum-corneum-Lipiden durch Liposomenbestandteile wurden an humanem Stratum corneum mit Hilfe der Spinsonde 5-Doxylpalmitinsäure durchgeführt. Untersucht wurden Liposomen aus den Grundlagen DOPC/CH/PG und P80/CH bzw. DPPC/CH/PG und P80H/CH mit einem Cholesterolanteil von 0, 30 bzw. 50 %. Als Kontrolle diente unbehandeltes bzw. mit Ölsäure oder Puffer behandeltes Stratum corneum. Ob die Fluidisierung der Stratum-corneum-Lipide ein zeitabhängiger Prozess ist, sollte durch Vermessung der Proben nach 1,0; 3,5 bzw. 7,0 h bestimmt werden.

Die Werte der Ordnungsparameter, die aus den ESR-Spektren von 5-Doxylpalmitinsäure in unbehandeltem Stratum corneum (Tab. 10, Kontrolle) berechnet wurden, sind für geordnete Strukturen von geringer Flexibilität charakteristisch. Für 5-Doxylpalmitinsäure ebenso wie für 5-Doxylstearinsäure [282], können daher als Aufenthaltsorte die geordneten, überwiegend aus Ceramiden mit unverzweigten und gesättigten Kohlenwasserstoffketten bestehenden Lipidlamellen angenommen werden, in denen Ceramide zusammen mit anderen Hautlipiden wie Cholesterol, Cholesterolester, Cholesterolsulfat und freien Fettsäuren kristalline bzw. gelartige Strukturen bilden.

Die Applikation von Phosphatpuffer auf das Stratum corneum führt zu einer Hydratisierung der Kopfgruppen der Ceramide, in deren Folge die kristallinen Strukturen der intercorneocytären Lipidlamellen aufgelockert werden, und die berechneten Ordnungsparameter der Spinsonde geringfügig abnehmen (Tab. 10, Puffer).

Tabelle 10 Maximale (A_{\max}), minimale (A_{\min}) und isotrope Hyperfeinkopplungskonstante bzw. Polarität (a_0) sowie die Ordnungsparameter S der Spinsonde 5-Doxylpalmitinsäure in separierter Epidermis nach epikutaner Applikation von Phosphatpuffer bzw. Ölsäure

Zubereitung	Zeit (h)	A_{\max} (mT)	A_{\min} (mT)	a_0 (mT)	S
Kontrolle	1,0	3,03±0,01	0,65±0,01	1,47±0,05	0,93±0,01
	3,5	2,95±0,03	0,62±0,00	1,46±0,06	0,95±0,00
	7,0	3,01±0,02	0,67±0,01	1,43±0,05	0,92±0,01
Puffer	1,0	2,84±0,01	0,70±0,01	1,42±0,01	0,86±0,01
	3,5	2,84±0,21	0,69±0,11	1,40±0,14	0,87±0,05
	7,0	2,99±0,09	0,76±0,05	1,50±0,06	0,84±0,02
Ölsäure	1,0	2,81±0,01	0,93±0,01	1,56±0,01	0,68±0,00
	3,5	2,90±0,05	0,90±0,07	1,57±0,04	0,72±0,05
	7,0	2,90±0,05	1,01±0,01	1,64±0,01	0,65±0,02

Die Inkubation des Stratum corneum mit den unterschiedlichen Liposomenformulierungen führt, unabhängig von der Lipidgrundlage der Liposomen, im Vergleich zu reinem Phosphatpuffer zu keiner weiteren Absenkung der Ordnungsparameter (Tab. 11).

Eine „dramatische“ Fluidisierung bzw. die Abnahme der Flexibilität der Lipiddoppelschichten durch Liposomen konnte, im Gegensatz zu der von Ogiso et al. [302, 304] an Liposomen aus Stratum-corneum-Lipiden durchgeführten Arbeit, nicht festgestellt werden. Die Unterschiede sind wahrscheinlich auf die im Stratum corneum vorhandenen und in Liposomen fehlenden Bindungen zwischen den Lipiden und den Proteinhüllen der Keratinozyten bzw. auf die Wirkung der Ceramide 1 und 4 zurückzuführen, die als „molekulare Nieten“ den Zusammenhalt der Lipidlamellen erhöhen und deren Flexibilität vermindern.

Tabelle. 11 Maximale (A_{\max}), minimale (A_{\min}) und isotrope Aufspaltung (a_0) sowie die Ordnungsparameter S der Spinsonde 5-Doxylpalmitinsäure in separierter Epidermis nach epikutaner Applikation von Liposomen mit verschiedenen Lipidgrundlagen

Lipid	CH-Anteil (mol %)	Zeit (h)	A_{\max} (mT)	A_{\min} (mT)	a_0 (mT)	S
DOPC/CH/PG	0	1,0	2,93±0,07	0,74±0,00	1,47±0,02	0,84±0,01
		3,5	2,75±0,05	0,63±0,00	1,34±0,02	0,90±0,01
		7,0	2,99±0,04	0,74±0,00	1,49±0,01	0,85±0,00
	30	1,0	2,76±0,06	0,65±0,01	1,36±0,02	0,88±0,01
		3,5	3,1±0,01	0,75±0,01	1,50±0,00	0,85±0,01
		7,0	2,80±0,06	0,66±0,02	1,37±0,03	0,88±0,00
	50	1,0	2,73±0,01	0,64±0,00	1,34±0,01	0,88±0,00
		3,5	2,89±0,01	0,69±0,00	1,42±0,00	0,87±0,00
		7,0	2,91±0,17	0,71±0,07	1,45±0,10	0,86±0,02
DPPC/CH/PG	0	1,0	2,82±0,01	0,67±0,01	1,38±0,01	0,88±0,01
		3,5	2,89±0,03	0,71±0,00	1,44±0,01	0,85±0,00
		7,0	2,76±0,05	0,65±0,02	1,36±0,03	0,88±0,01
	30	1,0	2,78±0,02	0,65±0,01	1,36±0,00	0,89±0,01
		3,5	2,83±0,02	0,71±0,01	1,41±0,01	0,85±0,01
		7,0	2,90±0,12	0,71±0,06	1,44±0,08	0,86±0,02
	50	1,0	2,82±0,03	0,68±0,01	1,39±0,01	0,87±0,00
		3,5	2,72±0,02	0,62±0,00	1,32±0,01	0,90±0,00
		7,0	2,80±0,02	0,66±0,01	1,37±0,01	0,88±0,01
P80/CH	0	1,0	3,02±0,01	0,80±0,02	1,54±0,02	0,81±0,02
		3,5	2,89±0,02	0,68±0,01	1,42±0,01	0,88±0,00
		7,0	2,81±0,17	0,68±0,09	1,39±0,12	0,86±0,04
	30	1,0	2,81±0,02	0,68±0,01	1,39±0,01	0,87±0,01
		3,5	2,87±0,01	0,66±0,01	1,40±0,01	0,90±0,01
		7,0	2,76±0,02	0,67±0,01	1,37±0,01	0,86±0,01
	50	1,0	3,08±0,01	0,76±0,01	1,53±0,01	0,86±0,01
		3,5	3,06±0,01	0,78±0,01	1,54±0,01	0,84±0,01
		7,0	3,04±0,04	0,77±0,01	1,52±0,01	0,84±0,01
P80H/CH	0	1,0	2,85±0,00	0,67±0,00	1,40±0,00	0,88±0,00
		3,5	2,91±0,01	0,68±0,01	1,42±0,01	0,89±0,01
		7,0	2,91±0,06	0,70±0,03	1,44±0,04	0,87±0,01
	30	1,0	3,04±0,01	0,79±0,01	1,54±0,01	0,83±0,01
		3,5	2,93±0,02	0,72±0,00	1,46±0,01	0,86±0,00
		7,0	3,01±0,03	0,78±0,02	1,52±0,02	0,83±0,01
	50	1,0	2,81±0,01	0,65±0,01	1,37±0,01	0,89±0,00
		3,5	2,90±0,01	0,75±0,01	1,46±0,01	0,83±0,01
		7,0	2,79±0,02	0,64±0,01	1,35±0,01	0,90±0,01

Ob die geringfügig veränderten Ordnungsparameter der Spinsonde im Stratum corneum nach

epikutaner Applikation von Liposomen durch die Ausbildung von separaten Lipiddomänen im Stratum corneum hervorgerufen werden [167], konnte mit der angewandten Auswertungsmethode nicht überprüft werden. Die durchgeführten Untersuchungen bestätigen jedoch die Ergebnisse anderer Autoren, die eine Mischung von Liposomenbestandteilen mit den Lipiddoppelmembranen des Stratum corneum anhand von veränderten Wiederholungsdistanzen der Lipiddoppelschichten nach der Applikation von Liposomen mit Hilfe des Röntgenkleinwinkelstreuung nachweisen konnten [305].

Eine Verminderung der Ordnungsparameter mit zunehmender Inkubationsdauer der Proben konnte nicht festgestellt werden.

Im Vergleich zur Applikation von Phosphatpuffer und Liposomen zieht die Applikation von Ölsäure, die als Penetrationsenhancer Verwendung findet, eine starke, zeitunabhängige Verringerung der Ordnungsparameter nach sich. Diese ist wahrscheinlich auf die gesteigerte Mobilität der Spinsonde in Ölsäuremikrodomänen mit geringem Ordnungszustand im Stratum corneum zurückzuführen. Die Ausbildung solcher Domänen konnte bereits durch thermoanalytische bzw. elektronenmikroskopische Untersuchungen z.T. an humanem Stratum corneum nachgewiesen werden [306 - 308]. Die Berechnung der isotropen Aufspaltung der Spinsonde (a_0) zeigt jedoch, dass ein Polaritätsunterschied zwischen der Mikroumgebung der Spinsonde in reiner Ölsäure ($a_0 = 1,29$ mT) und in dem mit Ölsäure vorbehandelten Stratum corneum ($a_0 = 1,59$ mT) vorliegt. Aus dem Vergleich der ESR-Spektren von 5-Doxylpalmitinsäure in Ölsäure bzw. im behandelten Stratum corneum geht hervor, dass die Mobilität der Sonde in Stratum corneum deutlich verringert ist. Beide Ergebnisse zeigen, dass die Eigenschaften von möglichen Ölsäuremikrodomänen im Stratum corneum erheblich von der Umgebung dieser Domänen beeinflusst werden bzw. legen die Vermutung nahe, dass es neben der Ausbildung von Mikrodomänen zu einer generellen Fluidisierung der Lipiddoppelschichten des Stratum corneum durch Ölsäure kommt.

3.3.4 Diskussion

Nachdem die Integrität von Liposomen nach epikutaner und subkutaner Applikation analysiert wurde, sollten durch weiterführende Untersuchungen anhand der Mobilität von

CAT-1 Erkenntnisse über die Fixierung von hydrophilen Substanzen durch Liposomenbestandteile auf der Haut gewonnen werden. Die Ergebnisse der Untersuchungen belegen, dass die Mobilität der Spinsonde nach epikutaner Applikation stark abnimmt, und der überwiegende Anteil der Spinsonde auf dem Stratum corneum kristallisiert. Es konnte gezeigt werden, dass die Mobilität der Spinsonde nach der Applikation in Liposomen aus hydrierten Phospholipiden langsamer abnimmt als nach der Applikation in Liposomen aus nicht hydrierten Phospholipiden. Dagegen führt ein Cholesterolanteil von 50 % im Vergleich zu Zubereitungen mit einem reduzierten Cholesterolanteil zu einer raschen Fixierung der Spinsonde auf dem Stratum corneum. Die Berechnung der Viskosität der Mikroumgebung von CAT-1 auf der Haut zeigt, dass diese innerhalb von 3,5 Stunden nach Applikation der Spinsonde auf die Haut von ca. 3 mPa·s auf maximal 1075 mPa·s zunahm.

Veränderungen der liposomalen Lipiddoppelmembranen, die nach epikutaner Applikation auftreten, wurden anhand der Mobilität der Spinsonde 5-Doxylpalmitinsäure bzw. ihrer Ordnungsparameter untersucht. Die Ergebnisse belegen, dass der kondensierende Effekt von Cholesterol auf die Lipiddoppelmembran von Liposomen aus nicht hydrierten Phospholipiden sowohl vor als auch nach deren epikutaner Applikation anhand der Zunahme der Ordnungsparameter der Spinsonde nachgewiesen werden kann. Mit der Applikation der Liposomen nimmt deren Membranflexibilität ab. Die Bestimmung der isotropen Hyperfeinaufspaltung der Spinsonde zeigt zudem, dass die Polarität der Mikroumgebung der Spinsonde mit steigendem Cholesterolgehalt zunimmt und nach der Applikation der Liposomen weiter ansteigt. Im Gegensatz zu Liposomen aus nicht hydrierten Phospholipiden zieht ein zunehmender Anteil an Cholesterol in Liposomen aus hydrierten Phospholipiden eine Flexibilisierung der Lipiddoppelmembranen nach sich. Diese konnte nach der Applikation der Liposomen nicht mehr nachgewiesen werden. Spinaustauschwechselwirkungen belegen vielmehr eine teilweise Entmischung der Lipidmembranen während der Auftrocknung der Liposomen. Die Ergebnisse der Untersuchung zeigen, dass es entgegen bisheriger Annahmen nach der Applikation nicht nur zu einer Veränderung des Dispersitätsgrads, sondern auch zu einer Änderung der Membraneigenschaften der Liposomen kommt.

Um Informationen über Mobilitätsänderungen der Stratum-corneum-Lipide durch epikutan

applizierte Liposomen und den Penetrationsenhancer Ölsäure zu erhalten, wurden die Ordnungsparameter der Spinsonde 5-Doxylpalmitinsäure nach deren Inkorporation in das Stratum corneum analysiert. Diese weisen die intercorneozytären Lipiddoppelschichten des Stratum corneum als geordnetes System von geringer Flexibilität aus. Es konnte gezeigt werden, dass durch die Inkubation der Hautproben mit Phosphatpuffer die Mobilität der Spinsonde im Stratum corneum erhöht wird. Die Inkubation mit den unterschiedlichen Liposomenformulierungen führt dagegen zu keiner weiteren Mobilitätszunahme. Eine als „dramatisch“ bezeichnete Fluidisierung der Lipiddoppelschichten durch Bestandteile von Liposomen aus nicht hydrierten Phospholipiden bzw. die Abnahme der Flexibilität der Lipiddoppelschichten durch Liposomen aus hydrierten Phospholipiden konnte im Gegensatz zu den von Ogiso et al. [302, 304] mit Liposomen aus Stratum-corneum-Lipiden erhaltenen Ergebnissen nicht festgestellt werden. Dagegen zieht die Applikation von Ölsäure eine starke, lang anhaltende Fluidisierung der Lipiddoppelschichten des Stratum corneum nach sich, verbunden mit einer Verringerung der Ordnungsparameter.

3.4 Fallspezifische Anwendung der ESR-Tomografie

Vor der Durchführung von Untersuchungen zur Veränderung der Hautpenetration von ESR-Spinsonden durch Liposomen sollten zunächst einige grundlegende Fragen zur Anwendung der ESR-Tomografie an Hautproben beantwortet werden. Dazu gehört die bisher in der Literatur nicht berücksichtigte Frage, ob die Anwendung der ESR-Tomografie zur Durchführung von biopharmazeutischen Untersuchungen an der Haut die Erfassung von räumlich-spektralen Informationen in definierten Hautschichten erlaubt. Weiterhin sollte geklärt werden, ob durch die Adaption des von Freed für die cw-Spektroskopie ohne räumliche Auflösung entwickelten Computerprogramms [49] spektrale Parameter von Spinsonden, wie z.B. die Rotationskorrelationszeiten aus ESR-Tomogrammen, bestimmt werden können.

3.4.1 Abbildung von Hautschichten mit der ESR-Tomografie

Die durchgeführten Untersuchungen sollten klären, inwieweit sich das Stratum corneum, die Epidermis und die Dermis mit der ESR-Tomografie aufgrund von unterschiedlichen hydrophilen und lipophilen Anteilen in den einzelnen Hautschichten differenzieren lassen. Daneben war von Interesse, welche Ausdehnungen die einzelnen abgebildeten Schichten in den Tomogrammen aufweisen würden.

Hierzu sollte die Abhängigkeit der Hyperfeinkopplungskonstanten der Spinsonde ^{15}N -TEMPO (vgl. 5.2.1.) von der Sondenumgebung genutzt werden. Im Unterschied zu ^{14}N -Nitroxylradikalen, die eine Kernspinquantenzahl von $I = 1$ aufweisen, zeigen ^{15}N -Nitroxylradikale ($I = \frac{1}{2}$) ein Signal-Doublett (Abb. 89). Aufgrund der Tatsache, dass die Fläche des ESR-Signals proportional zur Anzahl der freien Spins ist, ist im Fall von $I = \frac{1}{2}$ diese Fläche auf nur zwei Linien verteilt. Damit ergeben sich intensivere Signale, die sich deutlicher vom Rauschen abheben und die empfindliche Erfassung der Linienbreite und Signalamplitude erlauben. Zur Abbildung von Polaritätsunterschieden in einzelnen Hautschichten erschien ^{15}N -TEMPO daher besonders geeignet zu sein.

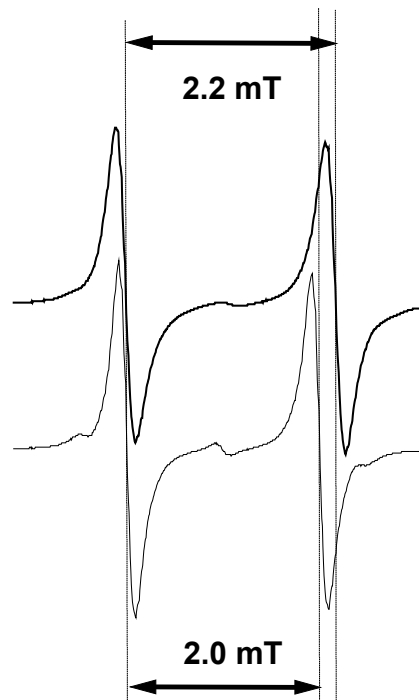


Abb. 89 Schematische Darstellung der Änderung der Signalaufspaltung der Spinsonde ^{15}N -TEMPO in Abhängigkeit von der Polarität ihrer Umgebung. oben: gelöst in bidestilliertem Wasser, unten: gelöst in Miglyol[®]

Nachdem im Rahmen dieser Arbeit eine Methode zur Bestimmung der Dicke von Hautproben aus ESR-Tomogrammen entwickelt worden war (vgl. 5.2.1), konnten anhand der ermittelten Werte der Hyperfeinkopplungskonstante a_N von ^{15}N -TEMPO, die in Abhängigkeit von der Tiefe der spektralen Schnittebene aus den ESR-Tomogrammen der humanen Hautproben bestimmt wurden, drei Hautbereiche differenziert werden (s. Abb. 90). Bereich I mit einem a_N -Wert von 2.13 mT und einer mittleren Ausdehnung von 290 μm entspricht dem Gesamtbereich der Epidermis der vermessenen Hautprobe. Im Anschluss daran nimmt die Hyperfeinkopplungskonstante zu und markiert den Übergang der Epidermis zur vergleichsweise zellarmen, wasserreichen Dermis, die vornehmlich aus locker verbundenen Fibroblasten und vernetzten Proteinfasern (Kollagen, Elastin, Retikulin) in einer amorphen Grundsubstanz (Mucopolysaccharide, Hyaluronsäure, Chondroitin) besteht. Die im oberen Drittel der Dermis (II) ermittelten a_N -Werte entsprechen annähernd den Werten, die für die Spinsonde ^{15}N -TEMPO in Wasser festgestellt wurden, und weisen auf die hohe Polarität dieses Bereiches hin. In einer Hauttiefe zwischen 930 bis 1200 μm kommt es dagegen zu einem gravierenden Abfall der Hyperfeinkopplungskonstante auf einen Wert von 2.0 mT (III), der dem a_N -Wert

einer Lösung der Spinsonde in dem Triglyceridgemisch Miglyol[®] entspricht. Dieser Wert bleibt im weiteren Verlauf der unteren Dermis bis zum Übergang zur Subcutis (Bereich zwischen 1200 und 2000 μm) annähernd konstant, wobei zu beachten ist, dass das subkutane Fettgewebe bei der Präparation der Hautproben entfernt wurde. Danach ist davon auszugehen, dass im unteren Bereich der Dermis lipophile Strukturen (Fettzellen) vorkommen, in denen sich die Spinsonde TEMPO aufgrund ihrer Lipophilie (n-Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizient = 63) anreichert.

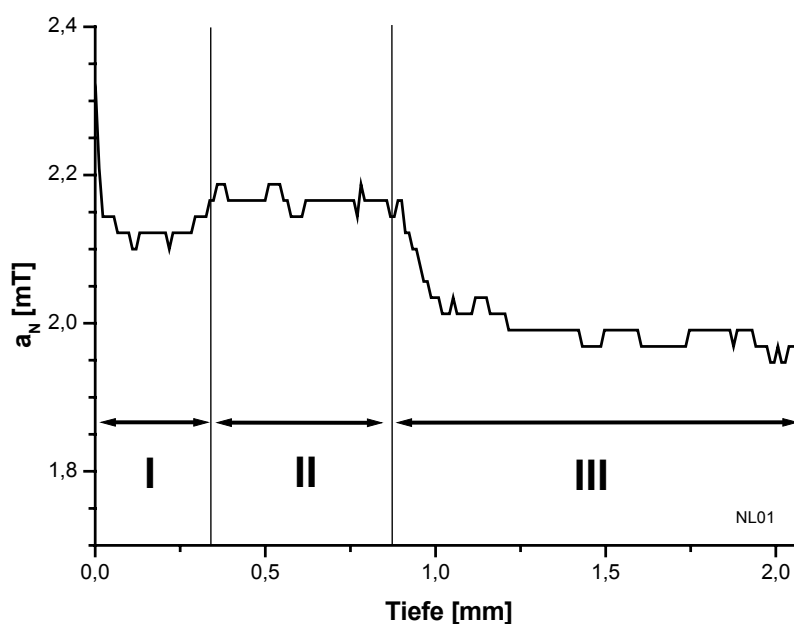


Abb. 90 Abhängigkeit der aus den Tomogrammen von humaner Bauchhaut ermittelten Werte der Hyperfeinkopplungskonstante a_N der Spinsonde ^{15}N -TEMPO von der Tiefe der spektralen Schnittebene und deren Zuordnung zu verschiedenen Bereichen der Haut (I: Epidermis, II: oberer Bereich der Dermis, III: unterer Bereich der Dermis)

Die mit Hilfe der ESR-Tomografie ermittelten Schichtdicken der differenzierbaren Hautabschnitte liegen im Bereich der in der Literatur zu findenden Werte (vgl. [67, 76, 84, 104]). Danach werden für die Epidermis eine durchschnittliche Dicke von 180 μm (bei einer Spannweite von 30 bis 1265 μm) und für die Dermis ein Durchschnittswert von 2500 μm (bei einer Spannweite von 300 – 500 μm) angegeben. Unterschiede ergeben sich vor allem bei der Vermessung von Proben aus unterschiedlichen Hautregionen, können aber auch durch den physiologischen Zustand (Ausprägung der Hornschicht, Hydratation) und methodisch bedingt sein. So ist zu berücksichtigen, dass die Hautoberfläche und auch die Übergänge zwischen verschiedenen Hautbereichen nicht planar sind (z.B. papillenförmiger Übergang zwischen

Epidermis und Dermis). Die aus den Tomogrammen gewonnenen spektralen Schnitte liegen dagegen in einer Ebene und repräsentieren daher in Übergangsbereichen jeweils die dominierende Komponente.

3.4.2 Modelluntersuchungen zur ortsabhängigen Mobilität von Spinsonden in Glycerol-Wasser-Mischungen

Zur Untersuchung von biopharmazeutischen Fragestellungen an der Haut ist die ESR-Tomografie erst von wenigen Autoren verwendet worden [309 - 312]. In deren Untersuchungen war die Auswertung der Penetration und räumlichen Verteilung der Spinsonden bzw. spin-gelabelten Arzneistoffe meist von vorrangigem Interesse. Nahezu keine Aufmerksamkeit wurde bisher auf die Auswertung der Aufspaltung bzw. der Linienbreite der entsprechenden ESR-Signale und die modellmäßig aus den Spektren zugängliche Mobilität von Spinsonden in der Haut und die daraus abzuleitenden Aussagen im Hinblick auf die Veränderung der Umgebungseigenschaften von Spinsonden durch epikutan applizierte, topische Zubereitungen gelegt [313, 314]. Dies ist wahrscheinlich auf die Schwierigkeiten mit zum Teil ungelösten Problemen zurückzuführen, die mit der Bestimmung der genannten Parameter verbunden sind. Zur Auswertung müssen zunächst ESR-Tomogramme durch eine mathematische Rückkonstruktion der registrierten Spektren erstellt und danach ortsabhängig in Einzelspektren zerlegt werden (vgl. 5.2.1). Diese müssen abgeleitet und anschließend gegebenenfalls geglättet werden, bevor die effektive Linienbreite der ESR-Spektren und die Mobilität der Spinsonden durch Spektrens simulation bzw. -anpassung bestimmt werden können.

Zur Bestimmung der Rotationskorrelationszeiten (τ_R) von Spinsonden als Maß für den Bewegungszustand bzw. für die Mobilität kann die bereits in Kapitel 3.3.1 angewandte empirische Beziehung (Gleichung 1) und das von Freed entwickelte Computerprogramm zur Berechnung von magnetischen Resonanz-Spektren [49, 315, 316] verwendet werden. Aus der Berechnung resultiert der dekadische Logarithmus des „rotational diffusion tensor“ (RBAR) als Bewegungsparameter der Spinsonden, der mit nachfolgender Gleichung in die entsprechenden Rotationskorrelationszeiten (τ_R) überführt werden kann:

$$\tau_R = \frac{1}{10^{RBAR}} \quad (7)$$

τ_R : Rotationskorrelationszeit

RBAR: Log 10 des „rotational diffusion tensor“

Die durchgeführten Untersuchungen sollten klären, welchen Anwendungsmöglichkeiten und Limitierungen sowohl die empirische Beziehung (Gleichung 1) als auch das Computerprogramm bei der Bestimmung von Rotationskorrelationszeiten aus ESR-Tomogrammen unterliegen. Dazu liegen bisher keine Erfahrungen vor.

Für die folgenden Untersuchungen wurden Lösungen der Spinsonden CAT-1, TEMPO, TEMPOL und TEMPOL-benzoat in Glycerol-Wasser-Mischungen mit definierter Viskosität sowohl cw-spektroskopisch als auch tomografisch im X-Band vermessen, und anschließend die Rotationskorrelationszeiten der Spinsonden bestimmt.

Die Auswertung der Rotationskorrelationszeiten aus cw-Spektren mit der Amplitudenmethode (s. Abb. 82) zeigt, dass die Rotationskorrelationszeiten erwartungsgemäß sowohl von der Molekülgeometrie der Spinsonden, als auch von der Viskosität der Spinsondenumgebung abhängig sind (Abb. 91). Sie überstreichen einen Bereich von $5,34 \cdot 10^{-11}$ bis $6,82 \cdot 10^{-9}$ s und steigen mit zunehmender Molekülgröße in der Reihenfolge TEMPO < TEMPOL < CAT-1 < TEMPOL-benzoat an. Bei der Auswertung der Rotationskorrelationszeiten mit der empirischen Beziehung wurde bereits die erste Limitierung der Methode deutlich. Mit steigender Umgebungsviskosität der Spinsonden nimmt die Anisotropie der Spektren zu, und die Signalamplitude des Hochfeldpeaks ab (Abb. 92). Dadurch wird die Auswertung der Amplituden ungenau bzw. unmöglich. Aus diesem Grund ziehen einige Autoren die Amplitude des Niedrigfeldpeaks, der einer geringeren Veränderung unterliegt, zur Auswertung heran [232, 282]. Diese Vorgehensweise entspricht jedoch nicht den von Fraenkel und Freed entwickelten Grundlagen der Methode [287].

Mit Hilfe des Computerprogramms kann an alle gemessenen cw-Spektren unabhängig von deren Anisotropie ein simuliertes Gesamtspektrum angepasst und die Rotationskorrelationszeiten der Spinsonden bestimmt werden. Die berechneten Werte für τ_R liegen in einem Bereich von $1,08 \cdot 10^{-10}$ bis $2,12 \cdot 10^{-8}$ s und bestätigen die Abhängigkeit der Rotationskorrelati-

onszeiten von der Molekülgröße und der Viskosität der Mikroumgebung der Spinsonden (Abb. 91).

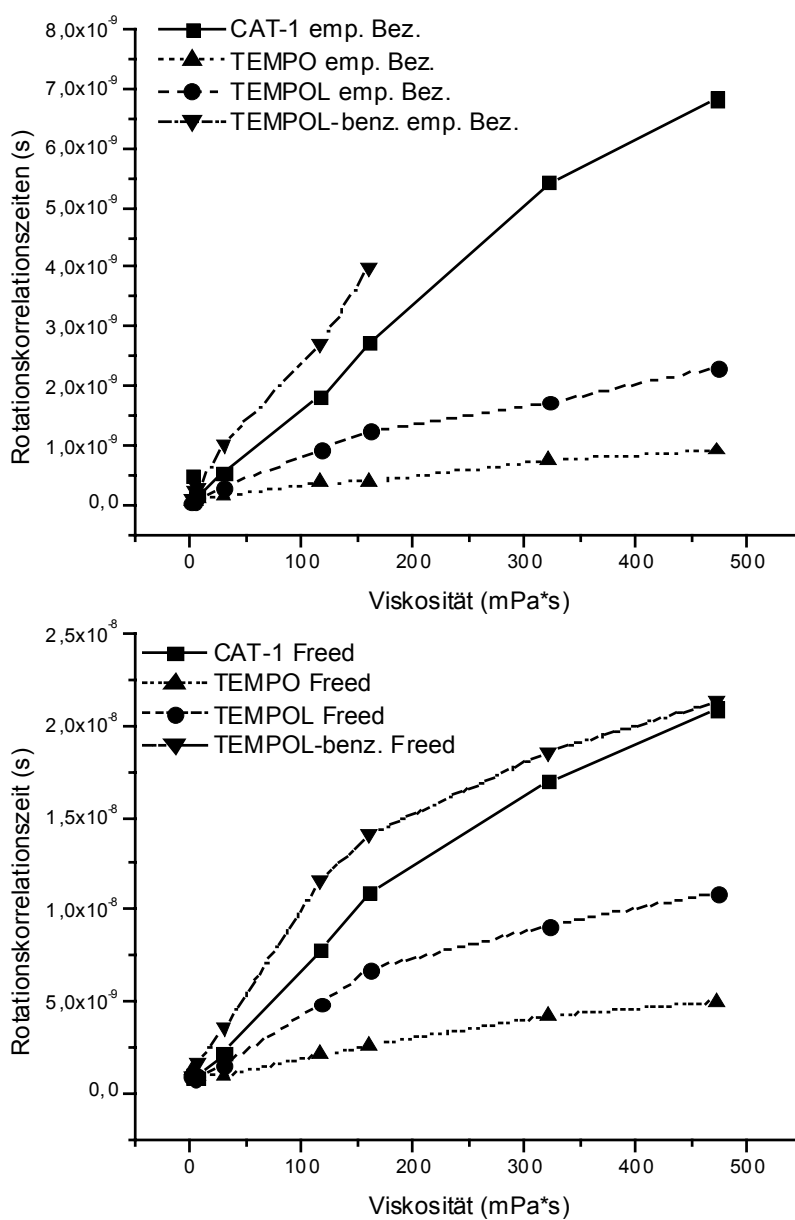


Abb. 91 Mit der empirischen Beziehung (oben) bzw. mit dem Computerprogramm nach Freed [49] (unten) berechnete Rotationskorrelationszeiten von verschiedenen Spinsonden in Abhängigkeit von der Viskosität ihrer Lösungsmittel (Glycerol-Wasser-Mischungen)

Die Abhängigkeit der Rotationskorrelationszeiten von der Molekülgröße und der Umgebungviskosität wird durch die nachfolgende Gleichung beschrieben:

$$\tau_R = \frac{4\pi \cdot \eta \cdot a^3}{3 \cdot k \cdot T} \quad (8)$$

τ_R : Rotationskorrelationszeit

η : Viskosität

a : Radius des Moleküls

k : Boltzmann-Konstante

T : Temperatur

Die Rotationskorrelationszeiten, die mit der empirischen Beziehung und dem Computerprogramm bestimmt wurden, unterscheiden sich deutlich voneinander. Die durch das Computerprogramm berechneten Ergebnisse weisen auf eine verlangsamte Bewegung der Spinsonden hin. Daher sind die Kurven, die sich aus der Abhängigkeit der Rotationskorrelationszeiten von der Viskosität der Zubereitungen ergeben, fast parallel zu den mit der Amplitudenmethode berechneten Kurven verschoben, und zwar in die Richtung längerer Rotationskorrelationszeiten. Gründe für die Differenzen könnten darin liegen, dass in der empirischen Beziehung, im Gegensatz zum Computerprogramm, weder die individuellen g-Faktoren (g_{xx} , g_{yy} , g_{zz}) noch die Aufspaltungen (a_{xx} , a_{yy} , a_{zz}) der einzelnen Spinsonden berücksichtigt werden, und vom Spektrum nur zwei bis drei Wertepaare verwendet werden.

Mit dem Übergang von der ESR-Spektroskopie zur ESR-Tomografie ergibt sich die Möglichkeit, Rotationskorrelationszeiten von Spinsonden in definierten Hautschichten zu bestimmen. In Abb. 93 sind beispielhaft für die untersuchten Spinsondenlösungen drei cw-Spektren und drei Spektren aus ESR-Tomogrammen einander gegenüber gestellt. Die Tomogramm-Spektren weisen im Vergleich zu den cw-Spektren erwartungsgemäß ein schlechteres Signal-Rausch-Verhältnis auf. Dieses wird dadurch begründet, dass bei der ESR-Tomografie die Intensität der Probe nicht wie bei der cw-Spektroskopie summarisch, sondern in Einzelspektren (Projektionen) mit unterschiedlicher räumlicher Kodierung erfasst wird (vgl. 5.2.1). Hinzu kommen aufnahmetechnische Besonderheiten, wie z.B. Gradienteninstabilitäten. Bei der ortsabhängigen Erfassung von Spinsonden in der Haut wird das Signal-Rausch-Verhältnis der Spektren gegenüber Lösungen weiter verschlechtert. Die Gründe hierfür sind stärkere dielektrische Verluste, die auf den Wassergehalt der Proben und ihre Dimensionierung zurückgehen. Weitere Gründe sind die Reduktion der Spinsonden in der

Haut und vor allem die von der Penetrationsrate abhängige Konzentration der Spinsonden in den einzelnen Hautschichten. Letztere kann sehr gering sein.

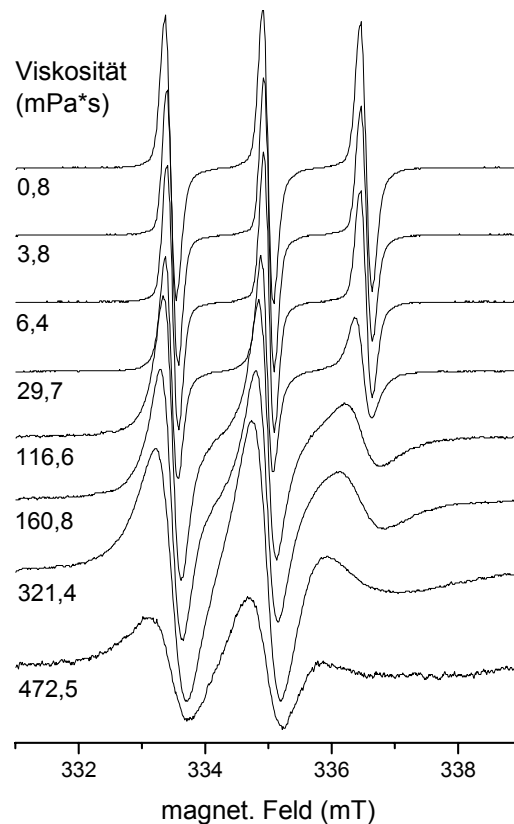


Abb. 92 X-Band-ESR-Signale der Spinsonde CAT-1 in Abhängigkeit von der Viskosität des Lösungsmittels (Glycerol-Wasser-Mischungen)

Das Signal-Rausch-Verhältnis ist jedoch ein weiterer limitierender Faktor für den Einsatz der empirischen Beziehung. Auf mäßig verrauschte Tomogramm-Spektren von Spinsonden, deren Rotation eingeschränkt ist wie in Abb. 93 (Mitte), kann diese Methode bereits nicht mehr angewendet werden, da die Amplituden der einzelnen Peaks nicht mehr eindeutig aus den Spektren zu bestimmen sind. Dagegen lassen sich mit einem Parametersatz, der durch die Anpassung von Spektren aus cw-Untersuchungen entwickelt wurde, die Rotationskorrelationszeiten aus verrauschten Tomogramm-Gesamtspektren mit Hilfe des Computerprogramms berechnen. Die Rotationskorrelationszeiten, die aus cw-Spektren und Tomogrammen durch Spektrenanpassung bestimmt wurden, weisen trotz des schlechteren Signal-Rausch-Verhältnisses der Tomogramm-Spektren nur geringe Unterschiede auf (Abb. 94).

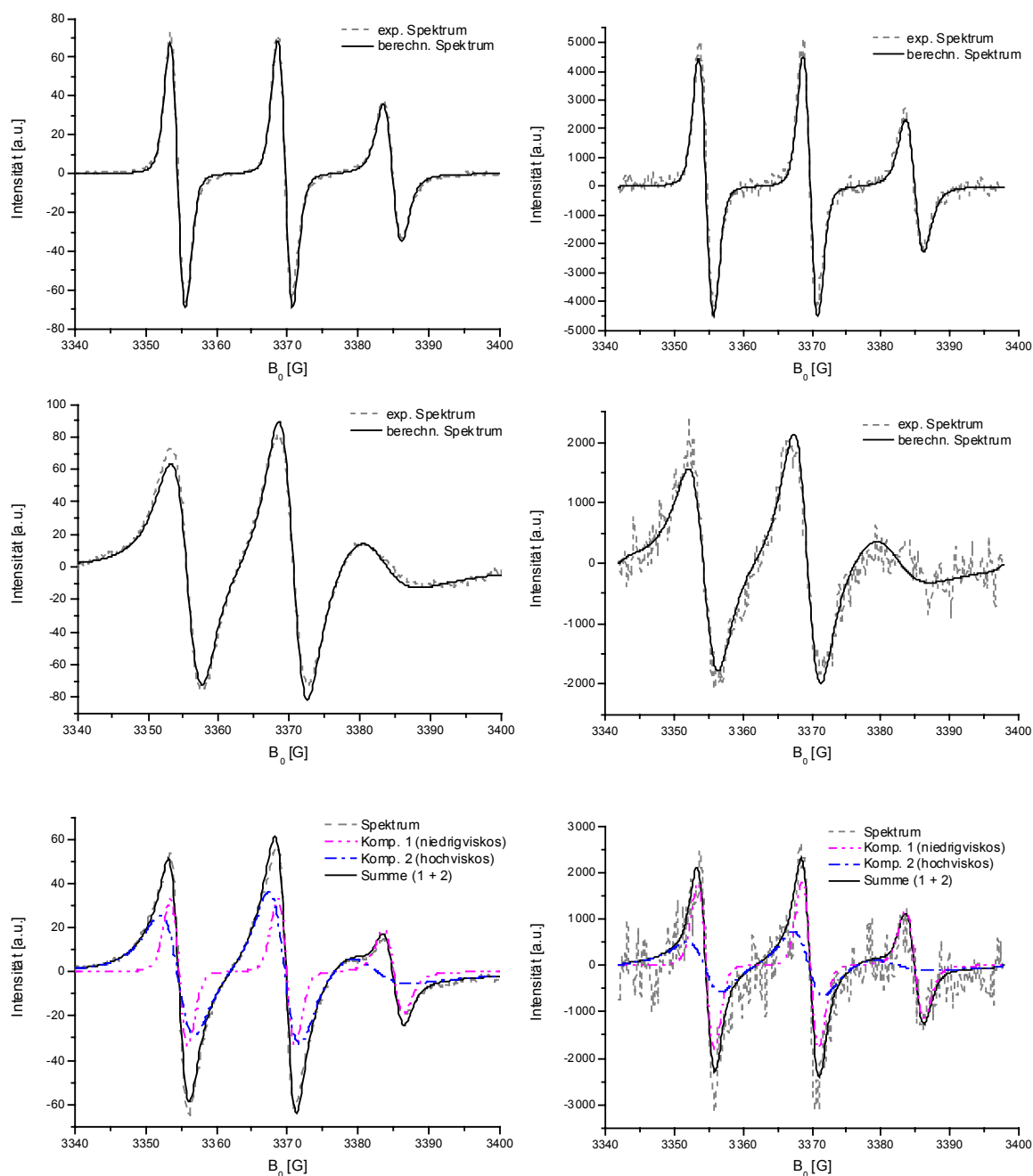


Abb. 93 X-Band-cw-Spektren (linke Spalte) und Schnitte aus den Tomogrammen (rechte Spalte) von 250 μM CAT-1-Lösungen zweier Viskositäten und ihren entsprechenden Anpassungen (obere Reihe: einzelnes ESR-Röhrchen mit Lösung der Viskosität 29.7 mPas; mittlere Reihe: einzelnes ESR-Röhrchen mit Lösung der Viskosität 321.4 mPas; untere Reihe: ineinander gestellte Röhrchen jeweils mit den oben vorgestellten Lösungen^e)

^e Die dabei auftretenden Änderungen von χ_g bzw. der dielektrischen Verluste sind gering.

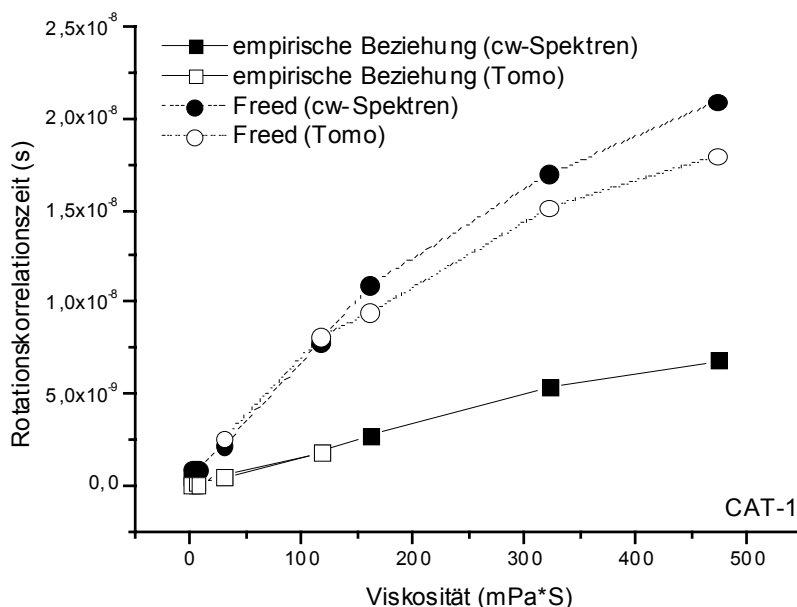


Abb. 94 Rotationskorrelationszeiten der Spinsonde CAT-1, bestimmt aus cw-Spektren und ESR-Tomogrammen, in Abhängigkeit von der Viskosität ihrer Umgebung (Glycerol-Wasser-Mischungen) und der zur Auswertung herangezogenen Methode

Liegen zwei Spinsondenspezies mit verschiedenen Rotationskorrelationszeiten in einem System vor, ergibt sich ein ESR-Spektrum, das aus der Überlagerung der Einzelspektren der zwei Spezies besteht (Abb. 93, unten). Im Gegensatz zur empirischen Beziehung ist mit Hilfe des Computerprogramms ist die Möglichkeit gegeben, die Rotationskorrelationszeiten der einzelnen Spezies und ihre Anteile am Gesamtspektrum zu berechnen. Um die Grenzen der Anpassungsgenauigkeit der simulierten Spektren an die gemessenen ESR-Spektren zu erkennen, wurden jeweils zwei ESR-Spektren der Spinsonde CAT-1 bzw. TEMPOL in Glycerol-Wasser-Mischungen mit unterschiedlichen Viskositäten in genau definierten Anteilen zu einem Gesamtspektrum überlagert. Anschließend wurden die Anteile der einzelnen Spezies durch Spektrenanpassung bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abb. 95 dargestellt. Danach beträgt die maximale Abweichung des ermittelten Flächenanteils vom Sollwert für die Spinsonde TEMPOL 22 %. Die Anpassungen des simulierten Spektrums an das Gesamtspektrum sind damit als gut einzustufen. Die Abweichungen des ermittelten Flächenanteils vom Sollwert für die Spinsonde CAT-1 sind in den Bereichen mit niedrigen Anteilen der mobilen Komponente am Gesamtspektrum hoch und betragen maximal 56 %. Mit steigenden Anteilen der mobilen Komponente verringern sich die Abweichungen vom Sollwert bis auf 2 %, weshalb auch diese Anpassungen des simulierten Spektrums an das

Gesamtspektrum als gut einzustufen sind.

Damit ist die Möglichkeit gegeben, koexistierende Bewegungszustände von Spinsonden in der Haut zu identifizieren, und die Rotationskorrelationszeiten sowie die Anteile der Spezies am Gesamtspektrum für einen bestimmten Ort zu berechnen.

Durch die Vermessung der Spinsonden-Lösungen im X-Band (9,5 GHz), S-Band (2,5 GHz) und L-Band (1 GHz) wurde eine Einschränkung für die Vergleichbarkeit der Rotationskorrelationszeiten, die aus Berechnungen mit der empirischen Beziehung hervorgehen, deutlich. Mit steigender Frequenz der Mikrowellenstrahlung nehmen die via Amplituden berechneten Rotationskorrelationszeiten der Spinsonden in allen vermessenen Lösungen zu. Das Ergebnis erscheint unwahrscheinlich, da die Lösungen nicht verändert wurden. Dagegen zeigte die Anpassung der Spektren mit Hilfe des Computerprogramms, dass die Rotationskorrelationszeiten der Spinsonden mit ansteigender Frequenz unverändert bleiben, die Linienbreiten der Spektren jedoch abnehmen. Da aus den ESR-Spektren abgeleitete Linienbreiten der Spinsonden direkt in der empirischen Beziehung berücksichtigt werden bzw. sich auf die Amplituden der Einzelpeaks und deren Verhältnis zueinander auswirken, erscheinen die Rotationskorrelationszeiten formal als frequenzabhängige Größen. Die empirische Beziehung wurde anhand von X-Band-Spektren entwickelt. Es können daher nur die Werte für die Rotationskorrelationszeiten von Spinsonden als gesichert angesehen werden, die aus X-Band-Spektren bestimmt wurden. Für die Bestimmung von Werten aus den Spektren, die im S- oder L-Band aufgezeichnet wurden, ist die Einführung eines Korrekturfaktors oder entsprechenden Modells notwendig.

Die durchgeführten Untersuchungen haben gezeigt, dass die Rotationskorrelationszeiten von Spinsonden in Glycerol-Wasser-Mischungen sowohl aus cw-Spektren als auch aus ESR-Tomogrammen mit Hilfe des Computerprogramms berechnet werden können. Im Gegensatz zu der empirischen Beziehung ist das Computerprogramm auch auf Spektren mit einem schlechten Signal-Rausch-Verhältnis anwendbar. Darüber hinaus bietet es die Möglichkeit, die Rotationskorrelationszeiten von zwei nebeneinander vorliegenden Spinsondenspezies zu bestimmen und die Anteile der Spezies am Gesamtspektrum orts aufgelöst zu quantifizieren. Im Gegensatz zur empirischen Beziehung sind die Ergebnisse des Computerprogramms unabhängig von der verwendeten Frequenz. Die in diesem Versuchsteil entwickelten

Grundparametersätze zur Anpassung von Spektren an gemessene ESR-Spektren der Spinsonden CAT-1, TEMPO, TEMPOL, TEMPOL-benzoat sollen in den folgenden Hautuntersuchungen zur Berechnung der Rotationskorrelationszeiten der Spinsonden in den einzelnen Hautschichten herangezogen werden.

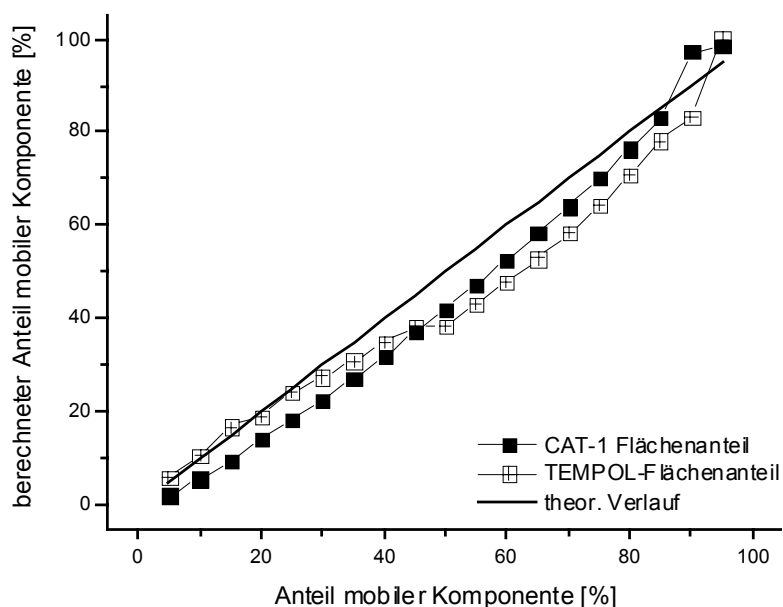


Abb. 95 Mit dem Programm nach Freed [49] berechneter Anteil der mobilen Komponente eines CAT-1- bzw. TEMPOL-Spektrums in Abhängigkeit vom Anteil der mobilen Komponente an einem Modellspektrum bestehend, aus mobiler und stark immobilisierter Komponente

3.4.3 Diskussion

Vor der Durchführung von Transportstudien mit der ESR-Tomografie sollte zunächst geklärt werden, ob diese die Erfassung von räumlich-spektralen Informationen in definierten Hautschichten erlaubt. Die Überprüfung der Möglichkeit einer nicht invasiven Erfassung und Abbildung der verschiedenen Schichten der Humanhaut erfolgte anhand der polaritätsabhängigen Hyperfeinaufspaltung der amphiphilen Spinsonde ^{15}N -TEMPO. Aufgrund der ortsabhängig ermittelten Hyperfeinaufspaltungen konnten die drei Hautbereiche Epidermis, obere Dermis und untere Dermis bzw. der Übergangsbereich zur Subcutis anhand ihrer unterschiedlichen Anteile an hydrophilen und lipophilen Strukturen differenziert werden. Die ermittelten Abmessungen der Hautabschnitte liegen im Bereich der in der Literatur zu findenden Werte.

Weiterhin wurde untersucht, ob durch die Adaptation des von Freed für die cw-Spektroskopie entwickelten Computerprogramms spektrale Parameter von Spinsonden, insbesondere deren Rotationskorrelationszeiten, aus ESR-Tomogrammen bestimmt werden können. Ergebnisse derartiger Untersuchungen liegen bisher in der Literatur nicht vor. Die anhand von Glycerol-Wasser-Mischungen durchgeführten Untersuchungen ergaben, dass die Rotationskorrelationszeiten von ESR-Spinsonden aus ESR-Tomogrammen mit Hilfe dieses Programms mit akzeptabler Genauigkeit berechnet werden können. Im Gegensatz zu der von Fraenkel und Freed angegebenen und vielfach genutzten empirischen Beziehung zur Berechnung von Rotationskorrelationszeiten konnte gezeigt werden, dass das Computerprogramm auch auf Spektren mit einem ungünstigen Signal-Rausch-Verhältnis anwendbar ist und die erzielten Ergebnisse unabhängig von der eingestrahnten Mikrowellenfrequenz sind (L-, S- bzw. X-Band-ESR). Darüber hinaus können durch die Anwendung des Computerprogramms die Rotationskorrelationszeiten von zwei nebeneinander vorliegenden Spinsondenspezies bestimmt und die Anteile der Spezies am Gesamtspektrum orts aufgelöst quantifiziert werden. Die Rotationskorrelationszeiten von Spinsonden sind erwartungsgemäß sowohl von der Molekülgeometrie als auch von der Viskosität der Mikroumgebung abhängig.

3.5 Mobilität von Spinsonden nach epikutaner Applikation von Liposomen

Liposomenzubereitungen wurden bereits von vielen Autoren mit dem Ziel untersucht, die Penetration von Arzneistoffen in die Haut bzw. die Permeation durch die Haut zu optimieren. Dabei kam neben einer Vielzahl von Liposomenformulierungen eine große Bandbreite verschiedener Untersuchungsmethoden und Hautmodelle zum Einsatz. Im Vergleich zu konventionellen Zubereitungen wie z.B. Hydrogelen, Salben und Lösungen wurde dabei meist eine erhöhte *Penetration* des Arzneistoffs bzw. Markers aus Liposomenzubereitungen festgestellt. Zur Beeinflussung der *Hautpermeation* von Arzneistoffen finden sich in der Literatur unterschiedliche Angaben. Für Benzocain und Progesteron konnte im Vergleich zu den Referenzsystemen eine niedrigere Hautpermeation nachgewiesen werden [242, 317]. Dagegen wird diese für Propranolol, Sotalol, Bifonazol und andere Arzneistoffe durch Liposomen z.T. deutlich verstärkt [248, 249]. Die unterschiedlichen Ergebnisse sind zum Teil auf die Auswahl des jeweiligen Bezugssystems zurückzuführen. So ist mit steigender Lipophilie der Arzneistoffe generell eine verminderte Penetration aus lipophilen Zubereitungen wie z.B. Salben und PEG-Lösungen in die Haut zu erwarten [318]. Zum anderen haben Untersuchungen mit radioaktiv markiertem Hydrocortison gezeigt, dass Liposomen im Gegensatz zu Salben zur Ausprägung eines Wirkstoffdepots in den oberen Hautschichten führen. Gleichzeitig wird dabei der Übergang von Hydrocortison ins Blut, d. h. die Hautpermeation und die Ausscheidung über den Urin, vermindert [319-321]. Die in *In-vivo*-Untersuchungen erzielten Ergebnisse zeigen, dass aus einer verminderten Hautpermeation von Arzneistoffen nicht auch automatisch auf eine verminderte Hautpenetration geschlossen werden kann.

Trotz der Vielzahl an Studien liegen bisher nur wenige Informationen darüber vor, wie Liposomen den Arzneistofftransport in die Haut verstärken, und welchen Einfluss die Zusammensetzung der Liposomen auf die Hautpenetration der Arzneistoffe und die Depotwirkung der Vesikel hat. Einige Autoren haben neben einer Abhängigkeit der Penetration ihres Markers von der Zusammensetzung der verwendeten Liposomen auch eine Abhängigkeit von der Art der Herstellung der Vesikel festgestellt [311]. Dieses Ergebnis erscheint jedoch unwahrscheinlich.

Im folgenden Kapitel sollten Untersuchungen zur Penetration von liposomal eingeschlosse-

nen Nitroxidspinsonden mit unterschiedlichen physikalisch-chemischen Eigenschaften, insbesondere variierender Lipophilie in die Haut, mit Hilfe der ESR-Tomografie durchgeführt werden. Für diese Versuche wurden unilamellare Liposomen mit unterschiedlichen Membranrigiditäten aus hydrierten (DPPC, P80H) und nicht hydrierten Phospholipiden (DOPC, P80) eingesetzt und mit den Spinsonden CAT-1, TEMPOL, TEMPOL-benzoat beladen. Durch den Vergleich der Zubereitungen mit konventionellen topischen Zubereitungen (Lösungen, Salben, Mikroemulsionen) sollten die Depotwirkung und die Penetrationsförderung in Abhängigkeit von der Auswahl der Liposomengrundlage, der Fluidität der Liposomenmembranen und der Hydro-/Lipophilie der eingesetzten Spinsonden charakterisiert werden.

Zur Beurteilung der Integrität von Liposomen nach der Applikation auf die Haut bzw. deren Depotwirkung ist es wichtig, dass zwischen verkapselten und freigesetzten Spinsonden differenziert wird. Dieses wird möglich, indem bei der Durchführung von Penetrationsstudien in einem Teil der Hautproben der Metabolismus der freigesetzten Sonde zum ESR-inaktiven Hydroxylamin gehemmt wird, und sich ein Vergleich mit solchen Hautproben anschließt, in denen die freigesetzte Spinsonde schnell umgesetzt wird. Die Hemmung des Spinsonden-Metabolismus in der Haut erfolgte dabei über eine Blockade reduzierender Hautfaktoren durch N-Ethylmaleinimid (NEM, vgl. [56]), das über die Ausbildung einer kovalenten Bindung Thiolgruppen blockiert [298].

Zur Beurteilung der Wechselwirkungen zwischen Liposomen und der Haut sollte im zweiten Teil der Untersuchung die polaritätsabhängige Hyperfeinaufspaltung der Spinsonden ortsabhängig bestimmt werden. Diese erlaubt Aussagen über die Polarität der Mikroumgebung von Spinsonden in der Haut und die Veränderung der Polarität durch epikutan applizierte Bestandteile von Liposomen und anderen topischen Zubereitungen.

Im Rahmen des vorangegangenen Kapitels sind neue Auswertungsmethoden entwickelt worden, die die Bestimmung der Mobilität von Spinsonden aus ESR-Tomogrammen der Haut erlauben. *Im letzten Teil der Untersuchung sollten durch die Auswertung der Rotationskorrelationszeiten der verkapselten Spinsonden Informationen über Veränderungen der Mobilität von Spinsonden in der Haut durch epikutan applizierte Zubereitungen erhalten werden. Von besonderem Interesse war die Frage nach dem Zusammenhang zwischen der Mobilität von Spinsonden in der Haut und dem Depoteffekt von Liposomen. Darüber hinaus sollte die Viskosität der Mikroumgebung von Spinsonden in der Haut analysiert werden.*

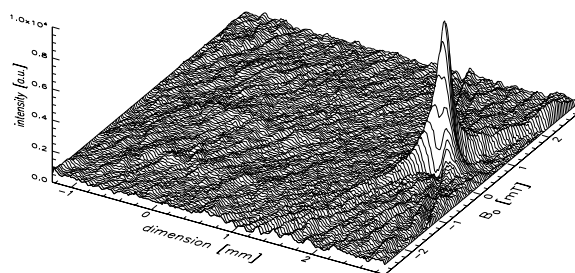
3.5.1 Räumliche Verteilung von CAT-1, TEMPOL und TEMPOL-benzoat in der Haut

Nachdem im Rahmen dieser Arbeit sowohl die Präparation von Hautproben als auch die Bedingungen für ESR-Untersuchungen an Hautproben erarbeitet wurden (vgl. 5.3.9.1), sollte nachfolgend untersucht werden, *ob mit Hilfe der ESR-Tomografie die zeitabhängige Penetration von Spinsonden in die Haut verfolgt werden kann*. Zu diesem Zweck wurden die Spinsonden CAT-1, TEMPOL, TEMPOL-benzoat ausgewählt, deren Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten sich deutlich voneinander unterscheiden ($P = 0$; 3,7 bzw. $\gg 100$). *Durch die Inkorporation der Sonden in Liposomen mit fluiden Lipidmembranen aus DOPC/CH/PG (6,5:3:0,5) und P80 bzw. solchen mit rigiden Lipidmembranen aus DPPC/CH/PG (4:5:1) und P80H/CH (6:4) sollte der Einfluss der Fluidität der Liposomenmembranen auf die Penetration der Spinsonden in die Haut untersucht werden. Die Verwendung von partialsynthetischen Lipiden (DOPC, DPPC) und Sojabohnenlecithinen (P80, P80H) sollte darüber hinaus Aussagen zur Bedeutung der in Sojabohnenlecithinen vorhandenen Begleitstoffe wie z.B. Lysolecithine für die Penetration der Spinsonden ermöglichen. Durch den Vergleich der Ergebnisse mit der Penetration der Sonden aus einer ethanoli-schen Lösung (40 Vol.%), einer Mikroemulsion und einer hydrophilen Salbe (modifiziert nach DAB10) in die Haut sollten Erkenntnisse über den penetrationsfördernden Effekt und den Depoteffekt von Liposomen in Abhängigkeit von der inkorporierten Spinsonde gewonnen werden. Letzterer sollte durch den Vergleich der Penetration der Spinsonden in Hautproben ohne und mit Enzymhemmung weiter charakterisiert werden.*

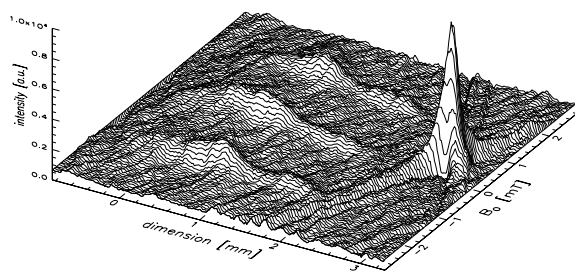
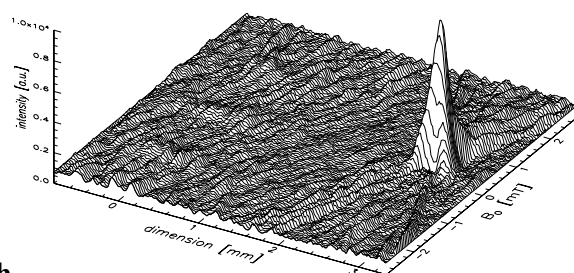
An dieser Stelle sei auf eine Besonderheit der hier angewandten ESR-Tomografie hingewiesen. Während in der ESR-Spektroskopie üblicherweise die erste Ableitung des Absorptionssignals registriert wird, fallen nach der Rückkonstruktion der ESR-Tomogramme die Signale in ihrer integrierten Form an. In Abb. 96 sind beispielhaft ESR-Tomogramme von Hautproben ohne und mit Enzymhemmung in Abhängigkeit von der Zeit nach der Applikation von CAT-1 in DOPC/CH/PG-Liposomen dargestellt.

Hautproben ohne Enzymhemmung

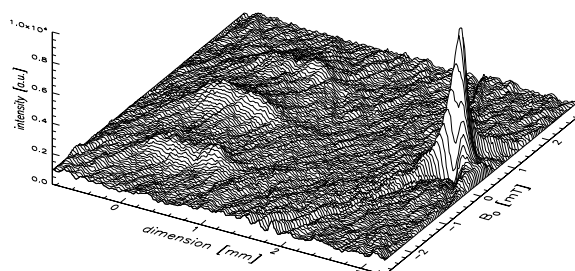
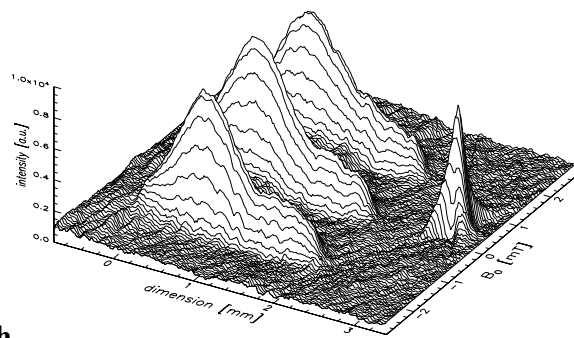
Hautproben mit Enzymhemmung



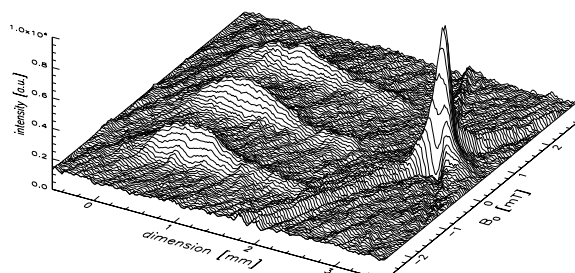
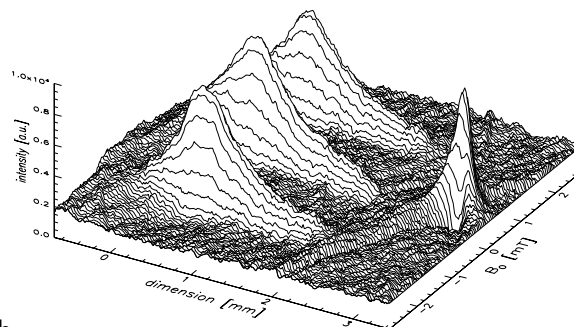
1,0 h



3,5 h



7,0 h



24 h

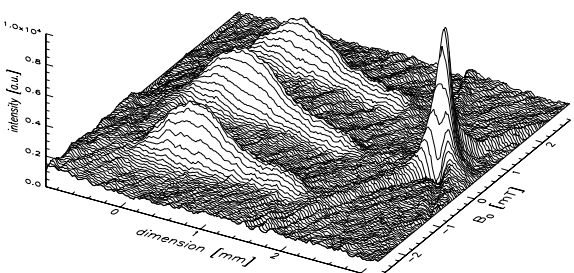


Abb. 96 ESR-Tomogramme unbehandelter und mit NEM vorbehandelter Hautproben 1,0; 3,5; 7,0 und 24 Stunden nach epikutaner Applikation von CAT-1 verkapselt in DOPC/CH/PG-Liposomen

Zur Auswertung der Signalintensitätsverteilung in der Haut wurden räumliche Schnitte aus den ESR-Tomogrammen angefertigt (vgl. 5.2.1). Aus den Schnitten wurde danach der Mittelwert und die zugehörige Standardabweichung der ESR-Signaleintensitäten unabhängig von der Liposomengrundlage berechnet. Durch dieses Vorgehen sollten zunächst allgemeine

Aussagen zur Penetration der Spinsonden in die Haut unter Berücksichtigung der methodischen Besonderheiten abgeleitet werden, bevor die Abhängigkeit der Penetration von der Liposomengrundlage berücksichtigt wurde.

CAT-1. In Hautproben ohne Enzymhemmung lagen nach der epikutanen Applikation von CAT-1 zeitunabhängig Signale von geringer Intensität vor (Abb. 97). Im gesamten Versuchsverlauf nahm die Signalintensität nur geringfügig zu. Die Absorptionssignale zeigten keine Maxima, sondern gleichmäßig verteilte Signalintensitäten in den oberen Hautschichten. Unmittelbar unter der Hautoberfläche wurden jedoch geringfügig erhöhte Signalintensitäten registriert. Wird die nach einer Stunde in tieferen Hautschichten bestimmte Signalintensität von ca. 1000 Einheiten als Wert für ein Grundsignal festgelegt, kann aus den Verteilungskurven der nachfolgend aufgezeichneten Tomogramme die Penetrationsfront der Spinsonde in der Haut bestimmt werden. Während nach einer Stunde nur Spuren eines CAT-1 Signals an der Hautoberfläche erkennbar waren, lag die Penetrationsfront nach 3,5 Stunden in einer Tiefe von 1,07 mm und nahm nach 7,0 bzw. 24 Stunden auf 2,13 bzw. 2,43 mm zu^f.

Eine Stunde nach der epikutanen Applikation von CAT-1 in Liposomen auf humane Hautproben mit Enzymhemmung waren die Signalintensitäten sehr gering. Im Gegensatz zu Hautproben ohne Enzymhemmung stieg die maximale Signalintensität innerhalb von 3,5 Stunden jedoch stark an. Mit weiter zunehmender Inkubationsdauer kam es zunächst zu einem Abfall der maximalen Signalintensität (7,0 Stunden), bevor sich diese bis zum Ende der Untersuchung nahezu verdoppelte.

Die Intensitätsmaxima der Absorptionssignale befanden sich in Hautproben mit Enzymhemmung nicht wie erwartet unmittelbar unter der Hautoberfläche, sondern waren in tiefere Hautschichten verschoben. Nach einer Inkubationsdauer von 3,5 Stunden wurde für das Maximum der Signalintensität eine Tiefe von 0,46 mm bestimmt. Dies entspricht nach der unter 3.4.1 durchgeführten Bestimmung der Ausdehnungen einzelner Hautschichten dem Bereich der Dermis.

^f In Modelluntersuchungen wurde ein Fehler von $\pm 10 \mu\text{m}$ bei der Bestimmung der Ortsauflösung ermittelt.

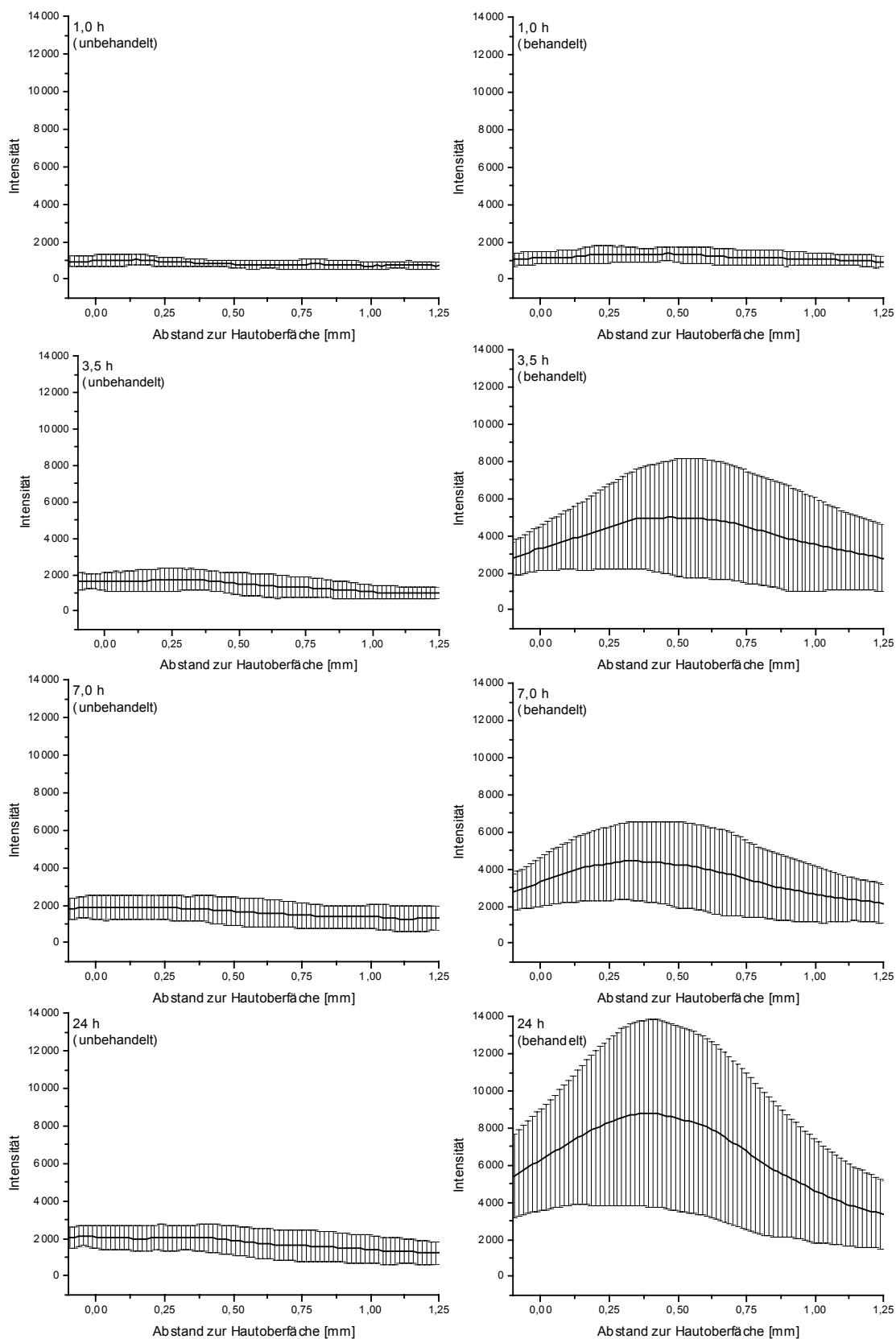


Abb. 97 Signalintensität von CAT-1 in unbehandelten (links) und mit NEM vorbehandelten (rechts) Hautproben in Abhängigkeit vom Abstand zur Hautoberfläche 1,0; 3,5; 7,0 und 24 Stunden nach epikutaner Applikation in Liposomen ($\bar{x} \pm s$; $n = 12$)

Im weiteren Verlauf der Untersuchung kam es zu einer Verlagerung des Intensitätsmaximums in höhere Hautareale. Nach 7,0 bzw. 24 Stunden befand sich das Intensitätsmaximum im oberen Grenzbereich der Dermis in einer Tiefe von 0,32 bzw. 0,39 mm.

Die Penetrationsfront der Spinsonde lag eine Stunde nach der Applikation in einer Tiefe von 1,19 mm und verschob sich im weiteren Verlauf der Untersuchung bis in eine Tiefe von ca. 2,2 mm. Da dieser Wert etwa der Gesamtausdehnung der verwendeten Hautproben entspricht, kann auf die vollständige Durchdringung der Haut mit Spinsonden geschlossen werden.

Der Vergleich der Signalintensitäten von Hautproben ohne und mit Enzymhemmung belegt die Reduktion der Spinsonden in der Haut und damit die metabolische Aktivität bzw. die Viabilität der unbehandelten Hautproben über den gesamten Versuchsverlauf. Das Ergebnis wird unterstützt durch Untersuchungen zur Lebensfähigkeit von exzidierten Humanhautproben, die anhand der Energiegewinnung auf dem Weg der anaeroben Glykolyse von anderen Autoren durchgeführt wurden. Diese belegen den Erhalt der Viabilität über einen Zeitraum von 24 Stunden in Durchflussskammern bei Verwendung von Akzeptormedien, die Glucose und andere Nährstoffe zur Versorgung der Haut bereitstellen [vgl. 322].

Aus der geringen Signalintensität von CAT-1 in Hautproben ohne Enzymhemmung kann abgeleitet werden, dass die Penetrationsgeschwindigkeit in die Haut nur geringfügig größer ist als die entsprechende Reduktionsgeschwindigkeit der Spinsonde in der Haut

Anhand der durchgeführten Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Penetration der Spinsonde CAT-1 in die Haut zeitabhängig mit Hilfe der ESR-Tomografie verfolgt werden kann. Durch die Auswertung der Tiefe der Penetrationsfront werden Unterschiede zwischen Hautproben ohne und mit Enzymhemmung deutlich. Während die Spinsonde innerhalb von 3,5 Stunden nach der epikutanen Applikation der Zubereitung vollständig in alle Schichten der Hautproben mit Enzymhemmung penetrierte, war die Penetration in Hautproben ohne Enzymhemmung scheinbar verzögert, da erst nach 7,0 Stunden ESR-Signale in allen Bereichen der Hautproben detektiert werden konnten. Die Unterschiede sind wahrscheinlich dadurch begründet, dass der überwiegende Anteil von CAT-1 in Hautproben ohne Enzymhemmung bereits in der Epidermis, dem Hauptort des kutanen Metabolismus, reduziert wird, bevor eine Penetration in die Dermis stattfindet. Die resultierenden diamagnetischen Verbindungen, die in tiefere Hautschichten penetrieren, können mit der ESR-Technik nicht erfasst werden. Verbleibende nicht-reduzierte Anteile von CAT-1 können erst detektiert werden,

wenn eine Konzentration der Spinsonde vorliegt, die eine Unterscheidung der ESR-Signale von denen des Grundsignals ermöglicht. Dies ist aufgrund der teilweisen Reduktion der Spinsonde in der Epidermis erst nach einer längeren Inkubationsdauer als bei Hautproben mit Enzymhemmung der Fall, woraus sich die scheinbar geringere Tiefe der Penetrationsfront erklärt. Als weiterer Einflussfaktor auf die Penetration von Spinsonden ist eine möglicherweise veränderte Permeabilität des Stratum corneum durch N-Ethylmaleinimid, das zur Hemmung reduzierender Hautfaktoren eingesetzt wurde, in Betracht zu ziehen. Ob N-Ethylmaleinimid zu einer veränderten Hautpermeabilität führt, kann mit Hilfe der ESR-Tomografie nicht abschließend beurteilt werden und sollte durch Permeationsstudien, die nicht Gegenstand dieser Arbeit waren, überprüft werden.

Durch die Auswertung der Intensitätsverteilungen der ESR-Signale von CAT-1 in der Haut wurde der Einfluss der Konzentration der Spinsonden auf die Amplituden der Absorptionssignale deutlich. Dieser ist bei der Durchführung von Penetrationsstudien mit Hilfe der ESR-Technik zu beachten und soll nachfolgend erläutert werden.

Die nach der Applikation von CAT-1 auf Hautproben mit Enzymhemmung eintretende Verschiebung der Intensitätsmaxima der Verteilungskurven in tiefere Hautbereiche (Abb. 97) widerspricht der Erwartung, dass die epikutane Applikation von Arzneistoffen bzw. Markern zunächst zur Ausbildung eines Konzentrationsmaximums in unmittelbarer Nähe zur Penetrationsbarriere der Haut führt, bevor eine Verteilung im gesamten Körper bzw. Akzeptormedium stattfindet. Die verminderte Signalintensität im Bereich der Epidermis wird z. T. dadurch bedingt, dass oberhalb einer gewissen Konzentration die Signalamplitude der Spinsonden nicht mehr proportional zu ihrer Konzentration ansteigt, sondern mit steigenden Konzentrationen abnimmt. Die Ursache dafür sind Dipol-Dipol- bzw. Spinaustauschwechselwirkungen zwischen den einzelnen Nitroxylradikalen, die zu einem Anstieg der Linienbreite bei gleichzeitiger Abnahme der Amplituden des ESR-Signals führen. Spektrale Schnitte, die aus den Tomogrammen von Hautproben mit Enzymhemmung in einer Penetrationstiefe von -50, 0, 50, 100, 250 und 500 μm entnommen wurden, belegen die Abnahme der Linienbreiten der ESR-Signale von CAT-1 mit zunehmender Penetrationstiefe in der Haut. In Abb. 98 sind beispielhaft die Linienbreiten der zentralen Linie und die Intensität der Absorptionssignale von CAT-1 in Hautproben mit Enzymhemmung nach einer Inkubationsdauer von 3,5 Stunden dargestellt. Mit Hilfe der Linienbreiten und Intensitäten der Absorptionssignale können Rück-

schlüsse auf die tatsächliche Konzentrationsverteilung der Spinsonde in der Haut gezogen werden, indem die approximierten integralen Intensitäten aus diesen Parametern berechnet werden [323]. Die Berechnung der approximierten integralen Intensitäten zeigt, dass die verminderten Signalintensitäten in den oberen Hautschichten nicht ausschließlich auf stark erhöhte Linienbreiten, sondern auch auf eine verminderte Spinsondenkonzentration zurückzuführen sind (Abb. 98). Die Verschiebung der Intensitätsmaxima in tiefere Hautschichten bzw. die erhöhte Konzentration der Spinsonde im Bereich der Dermis könnte daher auch auf die Polaritätsunterschiede der Hautschichten zurückzuführen sein. Nach den unter 3.4.1 durchgeführten Untersuchungen ist die Mikroumgebung der Spinsonde in der Epidermis apolarer als in der Dermis (Abb. 90). Daher ist eine Verdrängung der positiv geladenen Spinsonde CAT-1 aus der Epidermis und eine Anreicherung in der Dermis anzunehmen, die zu einer Zunahme der Amplituden der Absorptionssignale in diesem Bereich führt.

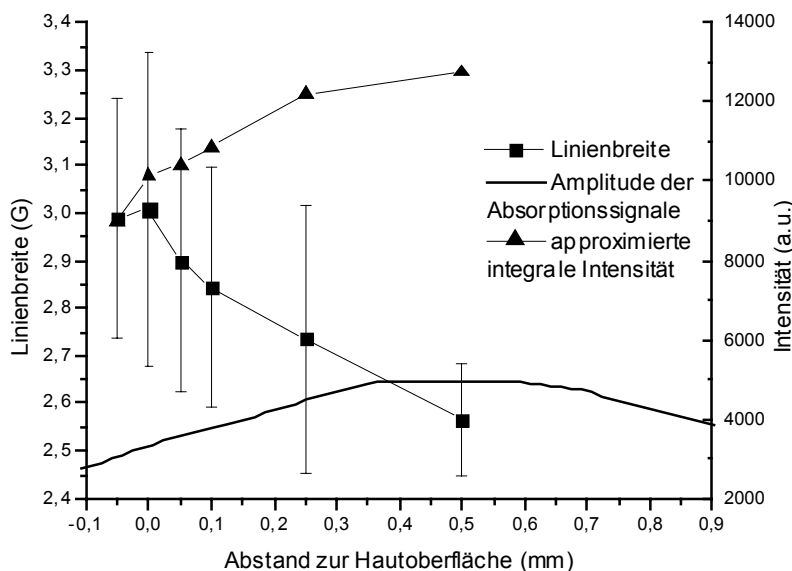


Abb. 98 Linienbreite der zentralen Linie ($\bar{x} \pm s$, $n=4$), Amplitude und approximierter integrale Intensität der ESR-Absorptionssignale von CAT-1 in Abhängigkeit von der Penetrationstiefe der Spinsonde in Hautproben mit Enzymhemmung nach einer Inkubationsdauer von 3,5 Stunden

Durch die oben erläuterten Ergebnisse wurde deutlich, dass die Amplituden der Absorptionssignale nur einen begrenzten Rückschluss auf die Konzentration von Spinsonden in der Haut zulassen. Vergleichende Aussagen zur Konzentrationsverteilung anhand der Amplituden sind nur dann zulässig, wenn die Spinsonden in großer Verdünnung vorliegen, und die Linienbreiten der ESR-Signale in den zu vergleichenden Bereichen der Haut nahezu übereinstimmen.

men. Dies wird für Hautbereiche angenommen, die in tieferen Hautschichten liegen als das Maximum der Intensitätsverteilung. Gesicherte Aussagen zur Konzentrationsverteilung sind jedoch nur dann möglich, wenn definierte Konzentrationen der Spinsonde in den einzelnen Hautschichten berechnet werden können. Dies ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt jedoch noch nicht zweifelsfrei möglich.

Im Gegensatz zu Hautproben mit Enzymhemmung kommt es in Hautproben ohne Enzymhemmung nicht zu einer Verschiebung der schwach ausgeprägten maximalen Signalintensitäten. Dies ist darauf zurückzuführen, dass in der metabolisch aktiven Haut die Konzentration der penetrierten Spinsonde ständig durch Reduktion vermindert wird. Darum erreicht zum einen nur ein geringer Teil der Spinsonde die Dermis, in der sich die Spinsonde in den Hautproben mit Enzymhemmung bevorzugt anreichert. Zum anderen entstehen wahrscheinlich keine lokalen Bereiche mit höheren Spinsondenkonzentrationen, in denen Dipol-Dipol- bzw. Spinaustauschwechselwirkungen zur Erhöhung der Linienbreite bzw. Verminderung der Signalamplitude führen. Aufgrund der sehr geringen Signalintensitäten von CAT-1 in Hautproben ohne Enzymhemmung konnte jedoch die Linienbreite der ESR-Signale in Abhängigkeit von der Penetrationstiefe der Spinsonde nicht ausgewertet und damit die geäußerte Vermutung nicht abschließend überprüft werden.

Aus den Verteilungskurven der Signalintensitäten kann abgeleitet werden, dass ein Konzentrationsgefälle zwischen dem Grenzbereich von Epidermis und Dermis und der Dermis bzw. Subkutis entstanden ist, das in einem Zeitraum von 3,5 bis 24 Stunden nach der epikutanen Applikation der Spinsonde erhalten blieb. Daraus kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass die untersuchten Liposomenformulierungen zu einer Fixierung der Spinsonde in den oberen Hautschichten führen und dadurch ein Depoteffekt für CAT-1 entsteht. Letzterer scheint nicht an die vesikuläre Form gebunden zu sein, wie ein Vergleich der Signalintensitäten von CAT-1 nach der Applikation auf Hautproben ohne und mit Enzymhemmung deutlich macht. Der Vergleich zeigt, dass die applizierten Liposomen die Spinsonde nicht dauerhaft vor der Reduktion in der Haut schützen können. Dies wird dadurch bedingt, dass die Liposomen zerfallen, und die Spinsonde in die Umgebung freisetzt wird (vgl. 3.2.1). Dagegen wäre die Spinsonde für den Fall der Penetration intakter Liposomen in die Haut bzw. des Erhalts der Vesikelstruktur in der Haut im Inneren der Liposomen vor der Reduktion durch Enzyme der Haut geschützt worden. Da es trotz des Zerfalls der Vesikel zu einer Fixierung der Spin-

sonde in den oberen Hautschichten kommt, kann davon ausgegangen werden, dass der Depot-effekt zwar an die Bestandteile der Liposomen, nicht aber an ihre vesikuläre Form gebunden ist.

Die Entwicklung der maximalen Intensitäten der Intensitätsverteilungskurven deuten auf eine zweiphasige Penetration von CAT-1 aus Liposomen in die Haut hin. Während die Intensität in den ersten 3,5 Stunden nach der Applikation der Zubereitungen anstieg, fiel sie nach 7,0 Stunden ab und nahm dann bis zum Ende der Untersuchung nach 24 Stunden wieder zu. Der zweiphasige Penetrationsverlauf ist darauf zurückzuführen, dass aus nicht dialysierten Liposomenzubereitungen die Spinsonde zunächst aus der äußeren Phase der Liposomen in die Haut penetriert. Zeitverzögert kommt es danach zur Penetration der Spinsonde aus dem Lipid-film, der mit zunehmendem Wasserverlust der Zubereitung auf der Haut entsteht (vgl. 3.3.1). Diese Erklärung wird auch dadurch untermauert, dass nach der Applikation von Liposomenzubereitungen, bei denen die Spinsonde aus der äußeren Phase durch Dialyse entfernt wurde, eine gleichmäßige Zunahme der maximalen Signalintensität im gesamten Untersuchungs-zeitraum erfolgte (Daten nicht abgebildet).

Nachdem aus den vorliegenden Ergebnissen Aussagen zur Penetration von CAT-1 aus Liposomen unter Berücksichtigung der methodischen Besonderheiten abgeleitet wurden, soll im nachfolgenden Abschnitt der Einfluss der Eigenschaften der ausgewählten Liposomen Grundlagen auf die Penetration von CAT-1 in die Haut und den Depoteffekt der Liposomen analysiert werden. In Abb. 99 sind die Verteilungsprofile der Signalintensität von CAT-1 in der Haut in Abhängigkeit von der Zeit nach der epikutanen Applikation in Liposomen aus den Lipidgrundlagen DOPC/CH/PG, DPPC/CH/PG, P80 bzw. P80H/CH dargestellt.

In den ersten 7,0 Stunden nach der epikutanen Applikation von CAT-1 in Liposomen auf Hautproben ohne Enzymhemmung lagen fast ausschließlich ESR-Signale von geringer Intensität vor. Im Gegensatz zu den anderen untersuchten Liposomenformulierungen führte die Applikation von CAT-1 in Liposomen mit der Lipidgrundlage P80H/CH nach 24 Stunden zu intensiven ESR-Signalen, die bis in eine Penetrationstiefe von mehr als 1,25 mm hineinreichten. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass die Lipidgrundlage P80H/CH die Spinsonde effektiv vor einer Reduktion in der Haut schützt. Da dieser Effekt erst nach 24 Stunden auftrat, liegt die Vermutung nahe, dass eine zeitverzögerte Penetration der Liposomenbestandteile in die Haut eintritt.

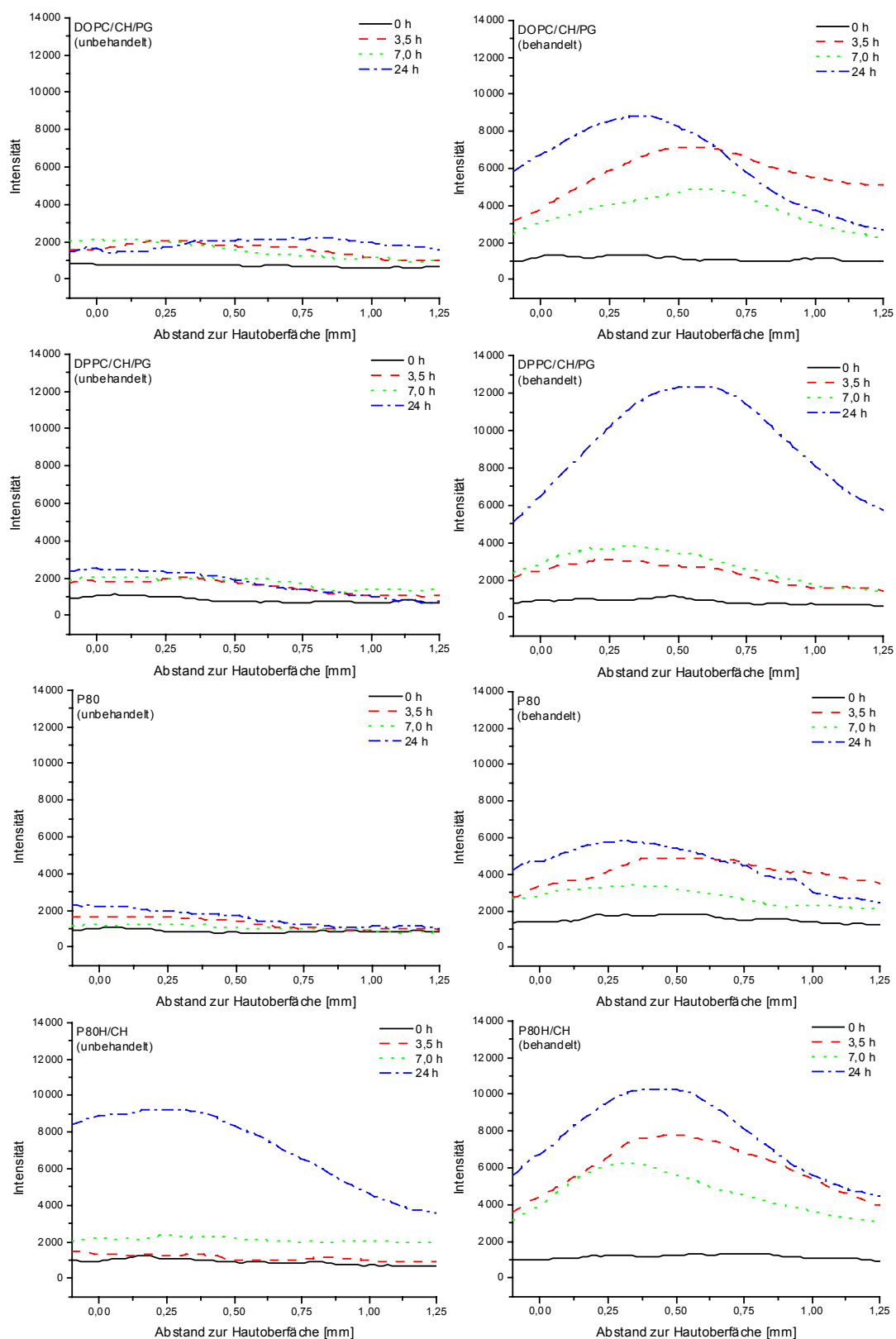


Abb. 99 Signalintensität von CAT-1 in Hautproben ohne (links) und mit (rechts) Enzymhemmung in Abhängigkeit vom Abstand zur Hautoberfläche 1,0; 3,5; 7,0 und 24 Stunden nach epikutaner Applikation in Liposomen mit verschiedenen Lipidgrundlagen (n = 3)

Ein erhöhter Reduktionsschutz bzw. eine verzögerte Freisetzung der Spinsonde konnte bereits unter 3.1.3.5 für P80H/CH-Liposomen nachgewiesen werden und wurde auf die erhöhte Membranviskosität dieser Liposomen zurückgeführt. Als Grund für die verminderte Reduktion der Spinsonde in der Haut müssen aber auch die Begleitsubstanzen der Sojabohnenlipide mit in Betracht gezogen werden, da die Reduktion durch Liposomen aus der partialsynthetischen Lipidgrundlage DPPC/CH/PG, die eine vergleichbare Membranviskosität aufweisen, nicht verhindert werden konnte.

Aus der epikutanen Applikation von CAT-1 in Liposomen auf Hautproben mit Enzymhemmung resultieren ESR-Signale von geringer bis hoher Intensität. Die maximale Intensität des CAT-1-Signals in der Haut nahm 3,5 bzw. 7,0 Stunden nach der Applikation in der Reihenfolge der Formulierungen $P80H/CH > DOPC/CH/PG > DPPC/CH/PG \geq P80$ ab. In den darauffolgenden 17 Stunden der Untersuchung stieg die Intensität des Signals von CAT-1 in der Haut nach Applikation der Formulierung DPPC/CH/PG stark an, woraufhin sich die Reihenfolge der maximalen Signalintensitäten änderte und nachfolgende Ordnung annahm: $DPPC/CH/PG > P80H/CH > DOPC/CH/PG > P80$.

Aus dem Vergleich der maximalen Signalintensitäten der einzelnen Zubereitungen in Hautproben mit Enzymhemmung geht hervor, dass die Applikation von CAT-1 in Liposomen aus Sojabohnenlipiden mit rigiden Lipidmembranen (P80H) im gesamten Untersuchungszeitraum zu einer höheren maximalen Signalintensität führt, als die Applikation der Spinsonde in Liposomen aus Sojabohnenlipiden mit fluiden Lipidmembranen (P80). Dieser Befund wird durch die Arbeit einer anderen Autorengruppe, die die Penetration einer Spinsonde mit Piperidingrundgerüst und positiver Ladung^g in die Haut vom Schwein mit Hilfe der ESR-Tomografie untersucht hat, bestätigt [324]. In dieser Arbeit konnte 25 Minuten nach der Applikation der Spinsonde ASL in Liposomen aus nicht hydrierten Sojabohnenlipiden keine Penetration festgestellt werden, während die Spinsonde nach der Applikation von Liposomen aus hydrierten Sojabohnenlipiden im gleichen Zeitraum bis in tiefere Hautschichten penetrierte.

Im Gegensatz zu diesen Befunden führte die epikutane Applikation von CAT-1 in Liposomen

^g ASL: [N-(1-Oxyl-2,2,6,6-tetramethyl-4-piperidinyl)-N-dimethyl-N-hydroxyethylammonium jodid]

aus partialsynthetischen Lipiden und mit fluiden Lipidmembranen in den ersten sieben Stunden der Untersuchung zu einer höheren maximalen Signalintensität, als die Applikation in Liposomen mit rigiden Membranen. Erst nach 24 Stunden resultieren auch hier höhere maximale Signalintensitäten aus der Applikation von Liposomen mit rigiden Lipidmembranen, als nach der Applikation von solchen mit fluiden Lipidmembranen.

Das Ergebnis, das in den ersten sieben Stunden nach der Applikation von CAT-1 in Liposomen mit partialsynthetischen Lipidgrundlagen erzielt wurde, entspricht den üblichen Modellvorstellungen. Danach erhöhen Liposomen mit fluiden Lipidmembranen die Penetration von Arzneistoffen bzw. Markern stärker als Liposomen mit rigiden Lipidmembranen, unabhängig von der Hydro-/Lipophilie der Arzneistoffe bzw. Marker. Als Grund für die verstärkte Penetration durch Liposomen mit fluiden Membranen wird eine Erhöhung der intercorneocytären Lipidmembranen des Stratum corneum postuliert. In eigenen Untersuchungen konnte zwar eine Erhöhung der Fluidität durch Liposomen nachgewiesen werden, doch war diese unabhängig von der Membranfluidität der applizierten Vesikel (3.3.3).

Aus dem Vergleich der Ergebnisse, die mit Sojabohnenlipiden und partialsynthetischen Lipiden innerhalb von sieben Stunden nach der epikutanen Applikation der Zubereitungen erzielt wurden, und bei dem die Membranrigiditäten der applizierten Liposomen berücksichtigt wurden, ergibt sich folgende Reihenfolge der maximalen Signalintensitäten: Liposomen aus Sojalipid mit rigiden Membranen > Liposomen aus partialsynthetischem Lipid mit fluiden Membranen > Liposomen aus Sojalipid mit fluiden Membranen > Liposomen aus partialsynthetischem Lipid mit rigiden Membranen.

Nach 24 Stunden nahm die maximale Signalintensität von CAT-1 in der Haut folgende Reihenfolge an: Liposomen aus Sojalipid mit fluiden Membranen < Liposomen aus partialsynthetischem Lipid mit fluiden Membranen < Liposomen aus Sojalipid mit rigiden Membranen < Liposomen aus partialsynthetischem Lipid mit rigiden Membranen.

Daher sind für eine effektive Penetration der Spinsonden in die Haut nach 24 Stunden Liposomen mit rigiden Membranen scheinbar besser geeignet als Liposomen mit fluiden Membranen, und solche aus partialsynthetischen Lipiden besser als Liposomen aus Sojabohnenlipiden.

Ein für alle Zeitbereiche gültiges Modell, mit dem die Frage beantwortet werden könnte,

welche Zusammensetzung bzw. Membranviskosität Liposomen aufweisen sollten, damit CAT-1 möglichst effektiv in die Haut penetriert, konnte anhand der vorliegenden Daten nicht entwickelt werden. Die Ergebnisse deuten vielmehr darauf hin, dass die Höhe der Signalintensität nicht nur auf das Ausmaß der Penetration von CAT-1 in die Haut, sondern auf eine Vielzahl bisher nicht bekannter Prozesse und Einflussfaktoren zurückzuführen ist. Dazu gehört vor allem die Reduktion von CAT-1 durch Reduktionsmittel bzw. Enzyme der Haut, deren Aktivität durch N-Ethylmaleinimid nicht beeinflusst wird. Weiterhin könnten Liposomenbestandteile, die zusammen mit der Spinsonde in die Haut penetrieren, diese geringfügig vor einer Reduktion schützen. Darauf deutet die nach 24 Stunden vorliegende Reihenfolge der maximalen Signalintensitäten hin, die weitgehend der umgekehrten Reihenfolge der Geschwindigkeitskonstanten entspricht, mit der die Spinsonde aus den untersuchten Liposomen freigesetzt wird (vgl. 3.1.3.5). Danach liegen hohe Signalintensitäten vor, wenn die Spinsonde in Liposomen mit rigiden Lipidmembranen appliziert wird, aus denen CAT-1 nur langsam freigesetzt wird. Ob der Reduktionsschutz auf eine erneute Verkapselung der Spinsonden in der Haut, die Einbindung der Spinsonde in lokale Depots mit hohen Phospholipidkonzentrationen oder andere Mechanismen zurückgeht, konnte nicht festgestellt werden.

Ebenso wie die bereits genannten Faktoren trägt auch die Dauer der Fixierung der Spinsonde in den oberen Hautschichten, d. h. der Depoteffekt der Liposomen, zur Ausprägung der maximalen Signalintensität in der Haut bei. Von diesem ist die Geschwindigkeit abhängig, mit der die maximale Signalintensität durch den Übergang der Spinsonden in das Akzeptormedium verringert wird.

Nachdem der Einfluss der Liposomengrundlage auf die maximale Signalintensität von CAT-1 in der Haut untersucht wurde, sollte sich nachfolgend ein Vergleich mit den topischen Zubereitungen Lösung, hydrophile Salbe und Mikroemulsion anschließen. Aus dem Vergleich sollten Aussagen zur Verstärkung der Spinsondenpenetration durch Liposomen abgeleitet werden. Darüber hinaus sollte untersucht werden, ob Liposomen die Spinsonde stärker in den oberen Hautschichten fixieren können, als die konventionellen Formulierungen.

Nach der epikutanen Applikation von CAT-1 in ethanolischer Lösung lagen in der Haut ohne Enzymhemmung erwartungsgemäß nur ESR-Signale von geringer Intensität vor (Abb. 100). In einem Bereich von ca. 0,6 mm bildet sich innerhalb von 24 Stunden ein Signalmaximum aus, das einerseits auf die Umverteilung der Spinsonde aus der Epidermis in die Dermis und

andererseits auf die im Vergleich zur Epidermis verminderte Spinsondenreduktion in der Dermis zurückzuführen ist.

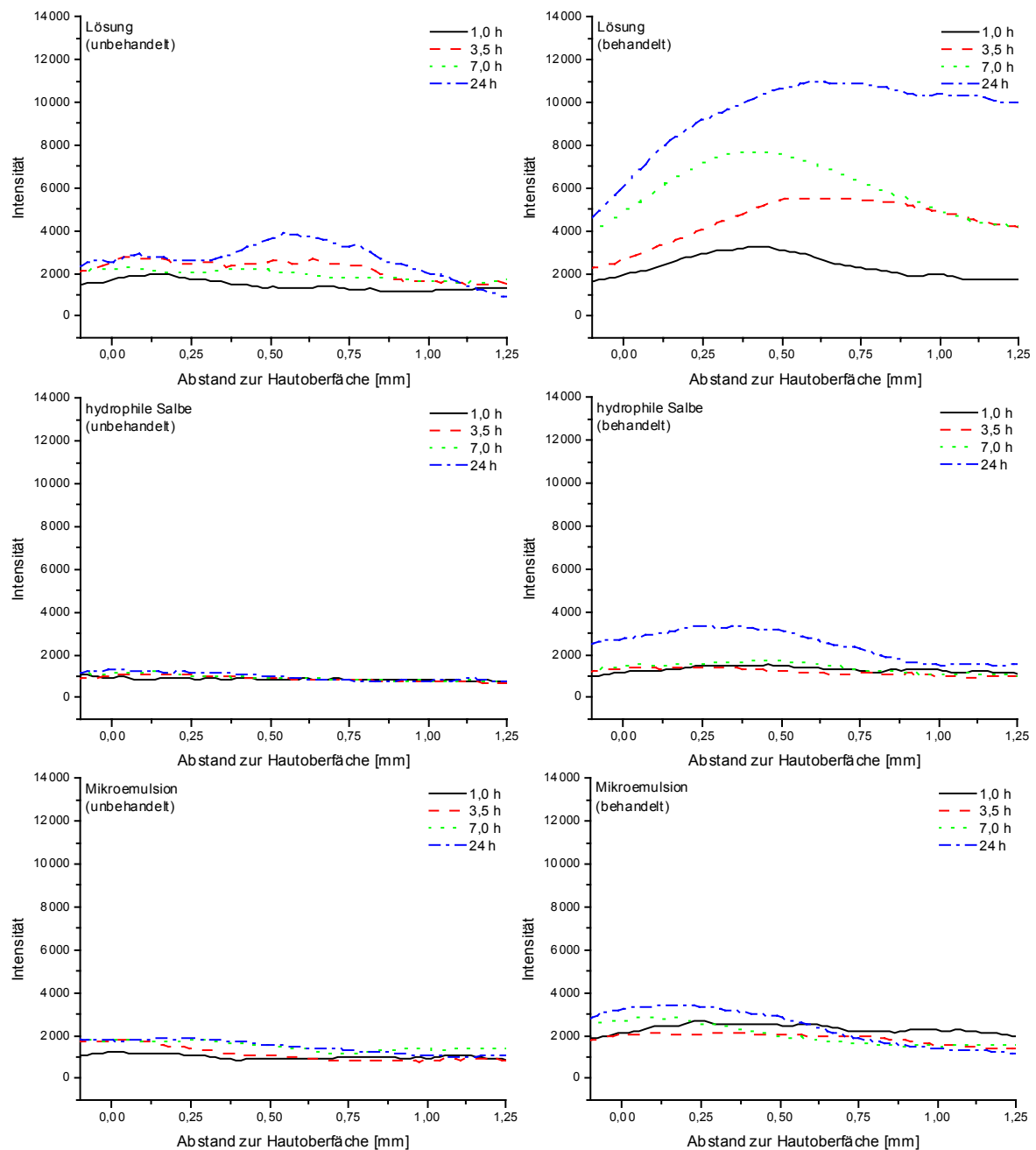


Abb. 100 Signalintensität von CAT-1 in Hautproben ohne (links) und mit (rechts) Enzymhemmung in Abhängigkeit vom Abstand zur Hautoberfläche 1,0; 3,5; 7,0 und 24 Stunden nach epikutaner Applikation in Lösung, hydrophiler Salbe bzw. Mikroemulsion (n = 3)

Nach der epikutanen Applikation der Zubereitung auf Hautproben mit Enzymhemmung stieg die Signalintensität innerhalb des gesamten Untersuchungszeitraums an. Die Penetrationsfront

der Spinsonde lag nach einer Stunde in einer Tiefe von 1,8 mm. Nach 3,5 Stunden konnte bereits keine Penetrationsfront mehr bestimmt werden, da in allen Hautschichten ESR-Signale vorlagen. Aus dem Ergebnis wird deutlich, dass die epikutane Applikation von Lösungen im Vergleich zu den untersuchten Liposomen zu einer schnelleren Penetration von CAT-1 in die Haut führt.

Der Vergleich der maximalen Signalintensitäten in der Haut, die aus der Applikation von CAT-1 in Liposomen bzw. Lösungen resultieren, liefert keinen Aufschluss über den penetra-tionsfördernden Effekt von Liposomen, da die Signalintensitäten innerhalb der Grenzen der Bestimmungsgenauigkeit übereinstimmen.

Im Gegensatz zu Liposomen führt die Applikation von CAT-1 in Lösungen nur nach sieben Stunden zu einem ausgeprägten Signalmaximum. Die übrigen Verteilungskurven zeigen zwar einen Anstieg der maximalen Signalintensität in den oberen Hautschichten, jedoch keinen ausgeprägten Abfall der Intensitätsverteilungskurve im Bereich der Dermis. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass eine gleichmäßigere Verteilung der Spinsondenkonzentra-tion in den Hautproben vorlag, als nach der Applikation von Liposomen. Es liegt daher die Vermutung nahe, dass Lösungen nicht zu einer Fixierung der Spinsonde in den oberen Haut-schichten führen bzw. keinen Depoteffekt aufweisen.

Die Applikation von CAT-1 in hydrophiler Salbe auf Hautproben ohne und mit Enzymhem-mung führt zur Ausbildung von ESR-Signalen, die eine geringe Intensität aufweisen (Abb. 100). Dabei unterscheidet sich die Intensität der ESR-Signale in behandelten und unbe-handelten Hautproben nur geringfügig voneinander. Die maximale Intensität lag 24 Stunden nach der Applikation auf Hautproben mit Enzymhemmung vor. Der Vergleich der Signalin-tensitäten von CAT-1 in Hautproben ohne und mit Enzymhemmung zeigt, dass die Spin-sonde aus der hydrophilen Salbe nur in begrenztem Umfang in die Haut penetriert. Die geringe Penetration könnte durch eine verminderte Freigabe der Spinsonde aus der Salbe verursacht werden, die durch Wechselwirkungen zwischen der positiven Ladung von CAT-1 und den negativen Ladungen des emulgierenden Cetylstearylalkohols der Salbe begründet werden kann. Desweiteren ist aber auch eine Verminderung der Penetration in der Folge einer Lipophilisierung der Hautoberfläche durch die lipophilen Bestandteile der Salbe denkbar.

Die Penetrationsfront verschob sich im Verlauf der Untersuchung aus einer Tiefe von 1,0 mm (3,5 Stunden) in eine Tiefe von 2,2 mm (24 Stunden). Da die Spinsonde aus der hydrophilen Salbe im Vergleich zu Liposomen nicht nur in geringerem Umfang, sondern auch langsamer in die Haut penetriert, kann auf einen penetrationsfördernden Effekt von Liposomen im Vergleich zu der verwendeten hydrophilen Salbe geschlossen werden.

Nach der epikutanen Applikation von CAT-1 in Mikroemulsion lagen in Hautproben ohne und mit Enzymhemmung nur geringe Signalintensitäten vor (Abb. 100). Daher kann von einer geringen Penetration der Spinsonde in die Haut nach der Applikation der Mikroemulsion ausgegangen werden. Im Vergleich zu Liposomen penetriert die Spinsonde aus der Mikroemulsion jedoch schneller in die Haut. Dies wird dadurch belegt, dass die Penetrationsfront bereits nach einer Stunde nicht mehr bestimmt werden konnte, da ESR-Signale in allen Hautschichten vorlagen. Im Vergleich zu der untersuchten Mikroemulsion weisen Liposomen in Bezug auf den Umfang der Spinsondenpenetration einen deutlich penetrationsfördernden Effekt auf. Dies gilt jedoch nicht für die Geschwindigkeit, mit der tiefere Hautschichten erreicht werden. Da die Spinsonde nach der Applikation in Mikroemulsion nicht in den oberen Hautschichten gebunden wurde, kann ein Depoteffekt der Zubereitung für CAT-1 ausgeschlossen werden.

TEMPOL. In Hautproben ohne Enzymhemmung lagen eine Stunde nach der epikutanen Applikation von TEMPOL ESR-Signale von geringer Intensität in den oberen Hautschichten vor (Abb. 101). Innerhalb der folgenden 2,5 Stunden nahm die maximale Signalintensität um ca. 3000 Einheiten zu und blieb über 3,5 Stunden nahezu konstant, bevor sie bis zum Ende der Untersuchung wieder abnahm. Die Maxima der Absorptionssignale der Spinsonde befinden sich in den ESR-Tomogrammen nahe der Hautoberfläche im Bereich der Epidermis, und zwar in einer Tiefe von maximal 0,05 mm. Die Penetrationsfront von TEMPOL lag eine Stunde nach der epikutanen Applikation in einer Tiefe von 0,64 mm und hat sich innerhalb der darauffolgenden 2,5 Stunden bis zu einer Tiefe von 1,88 mm verschoben. Nach einer Inkubationsdauer von 24 Stunden konnten ESR-Signale nur noch bis zu einer Penetrationstiefe von 1,17 mm nachgewiesen werden.

In Hautproben mit Enzymhemmung konnten eine Stunde nach der Applikation bereits ESR-Signale von geringer Intensität bis in den Bereich der unteren Dermis nachgewiesen werden.

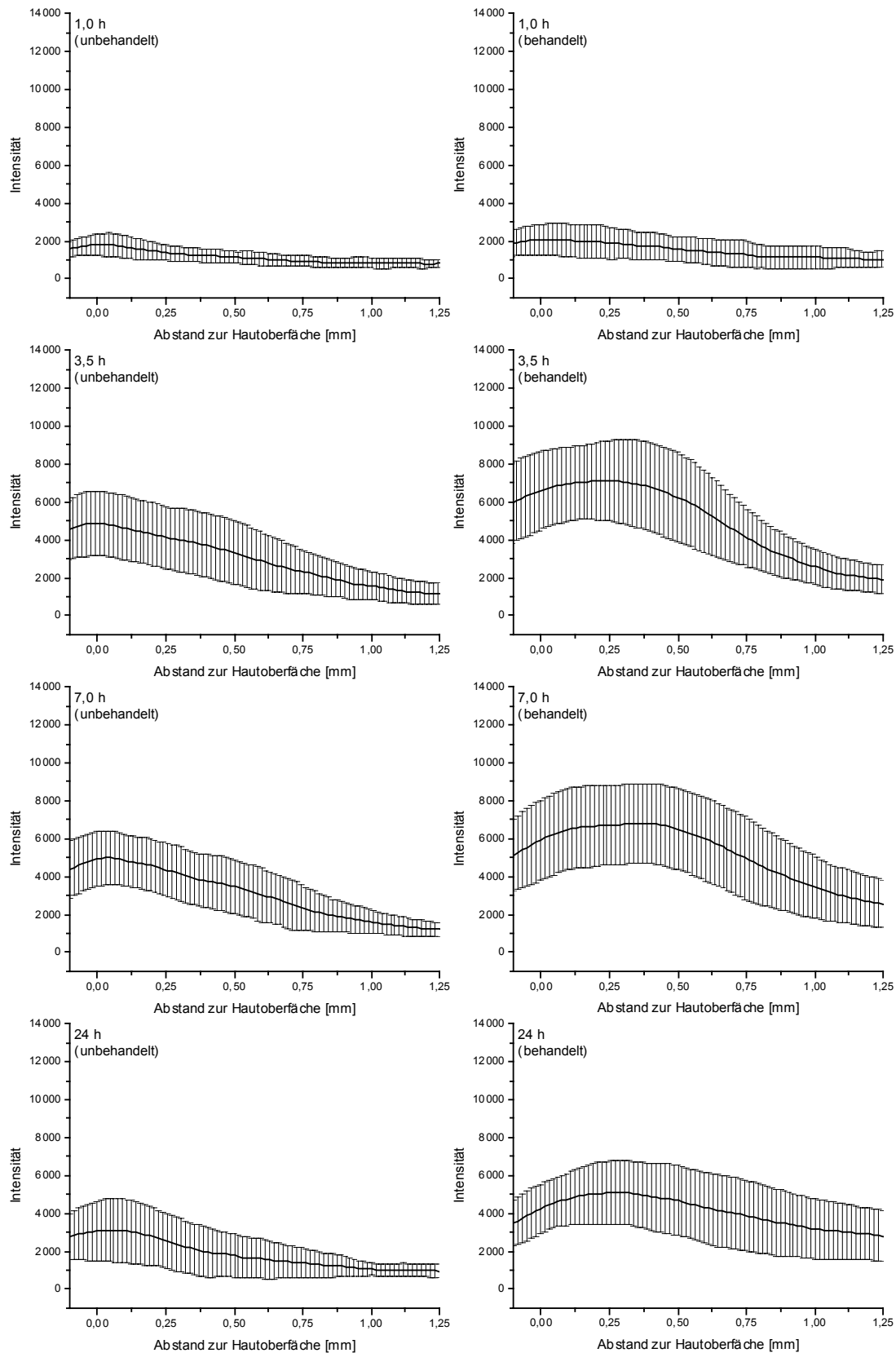


Abb. 101 Signalintensität von TEMPOL in unbehandelten (links) und mit NEM vorbehandelten (rechts) Hautproben in Abhängigkeit vom Abstand zur Hautoberfläche 1,0; 3,5; 7,0 und 24 Stunden nach epikutaner Applikation in Liposomen ($\bar{x} \pm s$; $n = 12$)

Aus den Verteilungskurven der Signalintensität kann abgelesen werden, dass die Signalintensität in den folgenden 2,5 Stunden zunächst stark anstieg, dann aber über 3,5 Stunden nahezu konstant blieb. Bis zum Ende der Untersuchung fiel die maximale Signalintensität wieder ab. Das Maximum der Absorptionssignale lag eine Stunde nach der Applikation der Zubereitung unmittelbar unter der Hautoberfläche in einer Tiefe von 0,04 mm. Die Intensitätsverteilungskurven der nachfolgend aufgezeichneten Tomogramme zeigen, dass eine Verschiebung der Maxima in eine Tiefe von ca. 0,25 mm, d. h. in den Bereich der Epidermis, stattgefunden hat. Diese Verschiebung blieb bis zum Ende der Untersuchung erhalten. Für die Penetrationsfront wurde eine Stunde nach der epikutanen Applikation der Zubereitung eine Tiefe von 1,32 mm und nach 3,5 Stunden eine Tiefe von 2,18 mm bestimmt. Dieser Wert entspricht etwa der Gesamtausdehnung der Hautproben.

Der Vergleich der Signalintensitäten von TEMPOL in Hautproben ohne und mit Enzymhemmung zeigt, dass eine Reduktion der Spinsonde im gesamten Untersuchungszeitraum stattgefunden hat. Dadurch wurde ebenso wie in den vorangegangenen Versuchen mit CAT-1 die metabolische Aktivität der Haut nachgewiesen.

Die relativ intensiven ESR-Signale in Hautproben ohne Enzymhemmung belegen, dass die Penetrationsgeschwindigkeit von TEMPOL größer sein muss als die entsprechende Reduktionsgeschwindigkeit der Spinsonde in der Haut. Damit unterscheidet sich TEMPOL deutlich von der Spinsonde CAT-1, deren Penetrationsgeschwindigkeit nur geringfügig größer ist als die entsprechende Reduktionsgeschwindigkeit. Die Unterschiede sind auf die Substituenten in Para-Position zur Nitroxylfunktion der Spinsonden zurückzuführen. Zum einen erleichtert die elektronenziehende, positiv geladene quartäre Ammoniumgruppe von CAT-1 im Vergleich zur Hydroxylgruppe von TEMPOL die Elektronenaufnahme am Sauerstoff der Nitroxylfunktion und erhöht damit die Reaktionsgeschwindigkeit der Reduktion [27]. Zum anderen wird die Penetration von TEMPOL in das Stratum corneum und tiefere Hautschichten durch die amphiphilen Eigenschaften der Spinsonde erleichtert.

In der ersten Stunde nach der epikutanen Applikation von TEMPOL lag die Penetrationsfront der Spinsonde in Hautproben ohne Enzymhemmung in geringeren Tiefen als in solchen mit Enzymhemmung. Diese Beobachtung ist auf den teilweisen Metabolismus der Spinsonde in der lebenden Epidermis von Hautproben ohne Enzymhemmung zurückzuführen, und wurde auch nach der epikutanen Applikation von CAT-1 gemacht. Nach 3,5 Stunden konnten die

ESR-Signale von TEMPOL bereits in allen Schichten von Hautproben ohne und mit Enzymhemmung registriert werden.

Der Vergleich der Penetrationstiefen von TEMPOL und CAT-1 belegt, dass TEMPOL schneller in größeren Tiefen der Haut nachgewiesen werden kann als CAT-1. So lag TEMPOL bereits eine Stunde nach der epikutanen Applikation auf Hautproben mit Enzymhemmung in einer Tiefe von 1,32 mm vor, während CAT-1 im gleichen Zeitraum nur bis zu einer Tiefe von 1,19 mm penetrierte. Darüber hinaus konnten nach 3,5 Stunden die ESR-Signale von TEMPOL in allen Schichten von Hautproben ohne und mit Enzymhemmung registriert werden, während dies erst nach sieben Stunden für CAT-1 möglich war. Die anhand der Signalintensitäten von TEMPOL in Hautproben ohne Enzymhemmung aufgestellte Vermutung, dass die Penetrationsgeschwindigkeit von TEMPOL im Vergleich zu der von CAT-1 erhöht ist, wird durch den Vergleich der Tiefen der Penetrationsfront in Hautproben ohne und mit Enzymhemmung gestützt.

In Hautproben mit Enzymhemmung sind die Maxima der Absorptionssignale von TEMPOL bis an den Grenzbereich zwischen der Epidermis und der Dermis verschoben (Abb. 101). In den oberen Hautschichten konnte eine Erhöhung der Linienbreiten der zentralen Linie nachgewiesen werden. Die Berechnung der approximierten integralen Intensitäten aus den Linienbreiten der zentralen Linie der Tomogrammspektren und den Amplituden der Absorptionssignale zeigt, dass das Konzentrationsmaximum von TEMPOL im Gegensatz zu den Amplituden der Absorptionssignale nicht in tiefere Hautschichten verschoben war, sondern unmittelbar unter der Hautoberfläche lag (Abb. 102). Es kann daher die Schlussfolgerung gezogen werden, dass die Verschiebung der Maxima der Intensitätsverteilungskurven in tiefere Hautschichten auf einen Linienbreiteneffekt und nicht auf einen Konzentrationsunterschied der Spinsonde zwischen der Epidermis und der Dermis zurückzuführen ist. Damit unterscheidet sich TEMPOL von CAT-1, dessen epikutane Applikation zu erhöhten Konzentrationen der Spinsonde in Grenzbereich zwischen der Epidermis und der Dermis führt. Diese Unterschiede sind auf die Verteilungskoeffizienten und damit auf die Struktur der Spinsonden zurückzuführen. Während TEMPOL aufgrund seiner amphiphilen Eigenschaften sowohl in der Epidermis als auch in der Dermis ausreichend solvatisiert wird, ist CAT-1 aufgrund seiner permanent positiven Ladung bestrebt, die vergleichsweise apolare Epidermis zu verlassen und die stärker polaren Strukturen der Dermis zu erreichen.

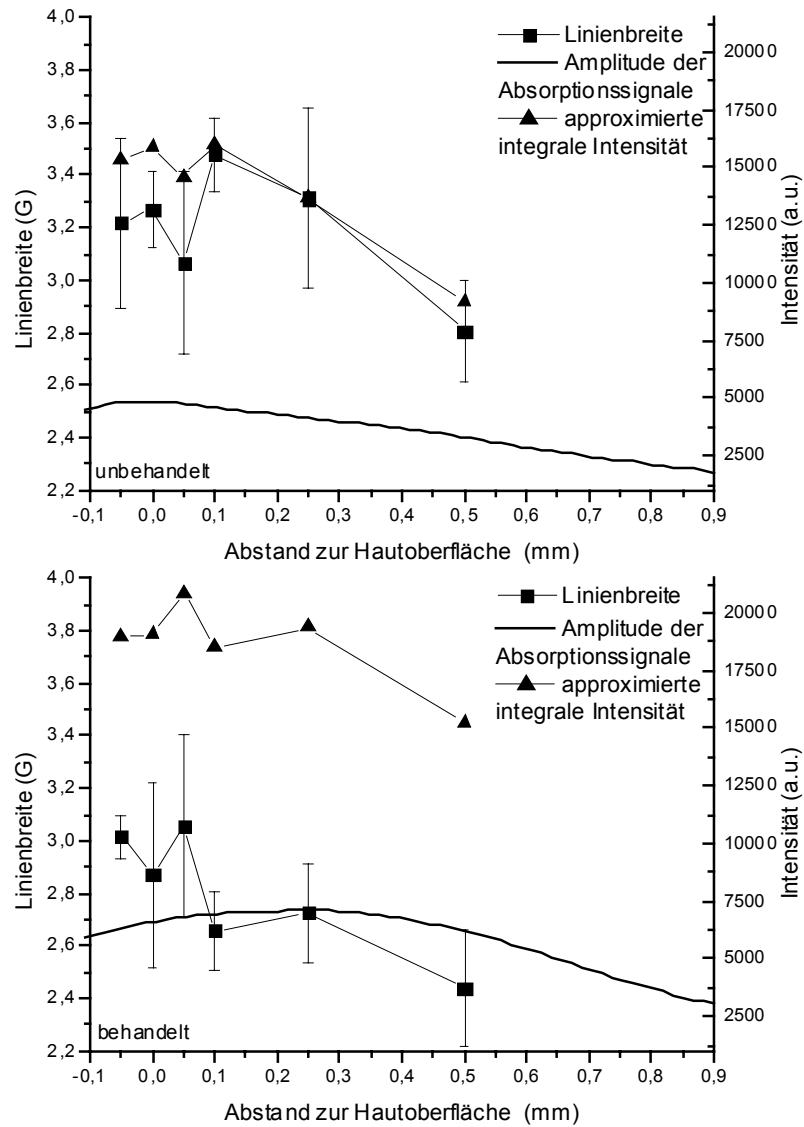


Abb. 102 Linienbreite der zentralen Linie ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$), Amplitude und integrale approximierte Intensität der ESR-Absorptionssignale von TEMPOL in Abhängigkeit von der Penetrationstiefe der Spinsonde in Hautproben ohne (oben) bzw. mit Enzymhemmung (unten) nach einer Inkubationsdauer von 3,5 Stunden

Im Gegensatz zu Hautproben mit Enzymhemmung liegen sowohl die Maxima der Signalintensität als auch die Maxima der approximierten Signalintensität in Hautproben ohne Enzymhemmung unmittelbar an der Hautoberfläche und sind nicht in tiefere Hautschichten verschoben. Die Auswertung der Linienbreiten der ESR-Signale in einem Abstand von -50, 0, 50, 100, 250 und 500 μm zur Hautoberfläche zeigt, dass eine Abnahme der Linienbreite mit zunehmender Penetrationstiefe der Spinsonde einhergeht. Daher liegen auch die Maxima der approximierten Signalintensitäten unmittelbar unter der Hautoberfläche.

Aus den Verteilungskurven der Signalintensitäten kann abgeleitet werden, dass es innerhalb der ersten 3,5 Stunden nach der epikutanen Applikation der TEMPOL-beladenen Liposomen zu einer starken Zunahme der Spinsondenkonzentration in der Haut kam. Die berechneten Mittelwerte der Verteilungskurven, die aus den nach 3,5 bzw. 7,0 Stunden aufgezeichneten Tomogrammen von Hautproben ohne bzw. mit Enzymhemmung entnommen wurden, unterscheiden sich dagegen nur geringfügig voneinander. Die lediglich geringen Veränderungen der Signalintensitätsverteilungen in diesem Zeitraum deuteten darauf hin, dass sich die Summe der Geschwindigkeiten aus der Reduktion bzw. Verteilung der Spinsonde in der Haut sowie dem Übergang der Spinsonde in das Akzeptormedium nahezu im „Gleichgewicht“ mit der Penetration der Spinsonde in die Haut befunden haben. Ein zweiphasiger Penetrationsverlauf wie nach der epikutanen Applikation von CAT-1-beladenen Liposomen konnte nicht festgestellt werden. Die bis zum Ende der Untersuchung nach 24 Stunden abnehmende Signalintensität in der Haut kann als Indiz für die Erschöpfung der Spinsonde in den epikutan applizierten Liposomen und die verstärkte Diffusion der Spinsonde in das Akzeptormedium gewertet werden. Die abnehmende Signalintensität spricht außerdem für eine geringe Fixierung der Spinsonde in den oberen Hautschichten, und damit für einen nur sehr schwach ausgeprägten Depoteffekt der untersuchten Liposomen für TEMPOL. Damit unterscheidet sich der Depoteffekt der Liposomen für die amphiphile Spinsonde TEMPOL und die positiv geladene Spinsonde CAT-1, die durch die untersuchten Formulierungen in den oberen Schichten der Haut über 24 Stunden fixiert wurde.

Nachdem im vorangegangenen Abschnitt die Penetration von TEMPOL in die Haut aus Liposomen unabhängig von der Zusammensetzung der Vesikel betrachtet wurde, sollte im nachfolgenden Abschnitt analysiert werden, welche der untersuchten Lipidgrundlagen zu einer effektiven Penetration von TEMPOL führen.

Nach der Applikation von TEMPOL-beladenen Liposomen mit den Lipidgrundlagen DOPC/CH/PG, DPPC/CH/PG, P80 und P80H/CH auf Hautproben ohne Enzymhemmung ergaben sich zeitunabhängig Verteilungsprofile der Spinsonde in der Haut, die nahezu übereinstimmen. Eine Aussage zu der Frage, welche Liposomengrundlagen zur effektivsten Penetration der Spinsonde in die Haut führt, kann aus den vorliegenden Ergebnissen nicht abgeleitet werden. Tendenziell sind jedoch die Mittelwerte der Signalintensitäten von TEMPOL nach der epikutanen Applikation von Liposomen aus den Grundlagen DPPC/CH/PG und P80H/CH

gegenüber Liposomen aus DOPC/CH/PG und P80 erhöht (Abb. 103).

Nach der epikutanen Applikation von TEMPOL-beladenen Liposomen auf Hautproben mit Enzymhemmung bestätigte sich diese Tendenz. Während die maximalen Signalintensitäten und die Verteilungskurven innerhalb der ersten 3,5 Stunden nach der Applikation von TEMPOL in DOPC/CH/PG, DPPC/CH/PG und P80 nahezu übereinstimmten, führte die epikutane Applikation in Liposomen aus P80H/CH bereits nach 3,5h zu einer größeren maximalen Signalintensität der Spinsonde in der Haut. In den darauffolgenden 3,5 Stunden nahm die Signalintensität von TEMPOL, das in Liposomen mit fluiden Lipiddoppelmembranen, d. h. in DOPC/CH/PG- bzw. P80-Liposomen appliziert wurde, geringfügig ab. Dagegen stieg die Signalintensität von TEMPOL im gleichen Zeitraum nach der Applikation von Liposomen mit rigiden Membranen, d. h. DPPC/CH/PG- und P80H/CH-Liposomen, leicht an. Die unterschiedliche Entwicklung der Signalintensitäten führte dazu, dass nach 7,0 Stunden die maximalen Signalintensitäten von TEMPOL in der Haut nach der Applikation von Liposomen mit rigiden Membranen größer waren, als nach der Applikation von solchen mit fluiden Membranen. Während bei den Liposomen mit den rigiden Membranen P80H/CH zu höheren Signalintensitäten als DPPC/CH/PG führt, ist eine Unterscheidung zwischen den Liposomen mit fluiden Lipidmembranen innerhalb der ersten 7,0 Stunden der Untersuchung nicht möglich. Nach einer Inkubationsdauer von 24 Stunden waren die maximalen Signalintensitäten von TEMPOL im Vergleich zu den nach 7,0 Stunden registrierten Intensitäten geringer. Die maximalen Signalintensitäten resultierten jedoch auch hier nach der Applikation von TEMPOL in Liposomen mit rigiden Lipidmembranen. Im Gegensatz zu den nach 7,0 Stunden erhaltenen Verteilungskurven lag 24 Stunden nach der Applikation von TEMPOL in Liposomen aus DPPC/CH/PG eine größere maximale Signalintensität vor, als nach der Applikation von P80H/CH-Liposomen. Weiterhin ist eine Unterscheidung zwischen den Signalintensitäten möglich, die nach der Applikation von TEMPOL in Liposomen mit fluiden Membranen registriert wurden. Die Applikation in DOPC/CH/PG-Liposomen führte hier zu einer größeren maximalen Signalintensität als die Applikation in P80-Liposomen.

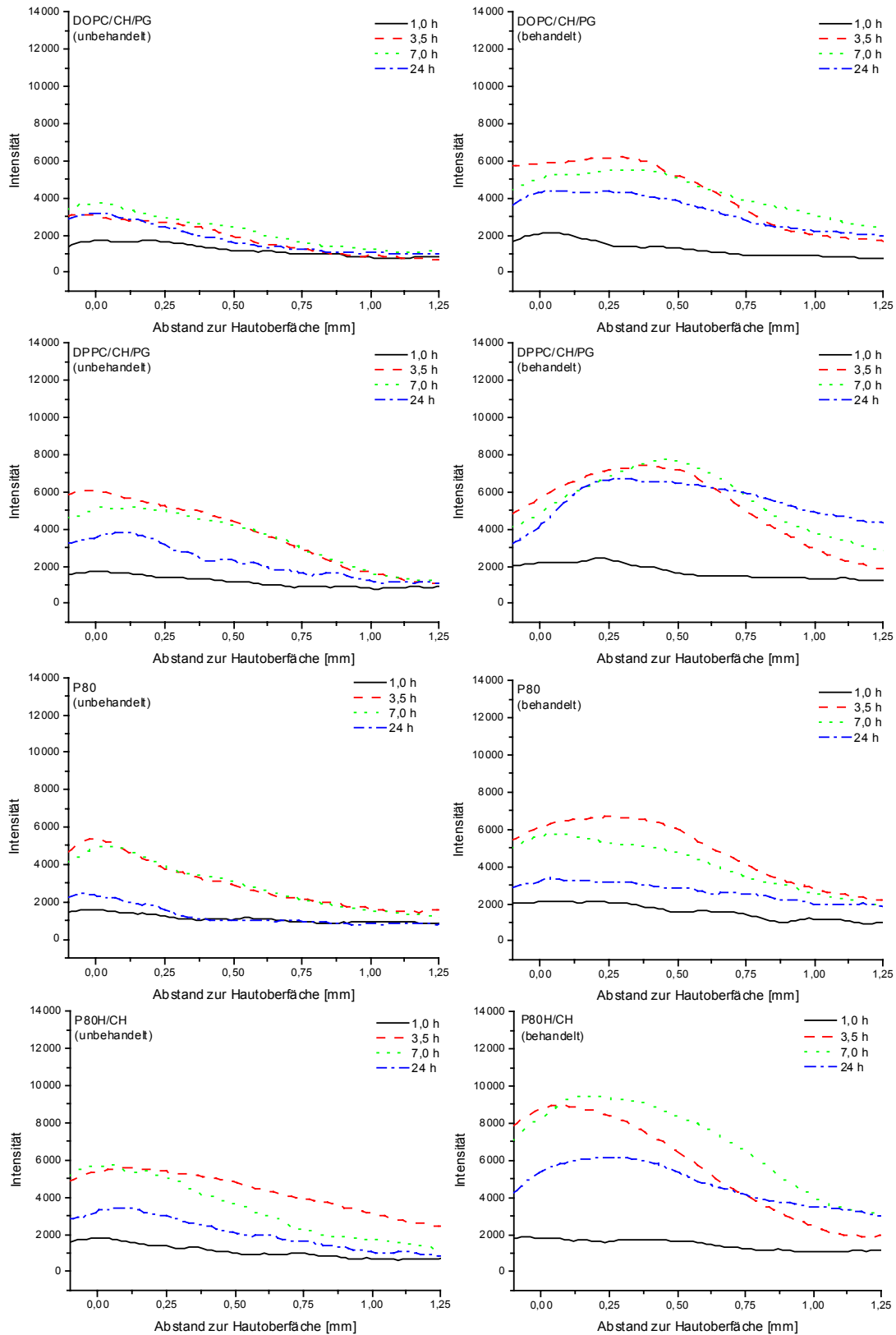


Abb. 103 Signalintensität von TEMPOL in Hautproben ohne (links) und mit (rechts) Enzymhemmung in Abhängigkeit vom Abstand zur Hautoberfläche 1,0; 3,5; 7,0 und 24 Stunden nach epikutaner Applikation in Liposomen mit verschiedenen Lipidgrundlagen (n = 3)

Damit ergibt sich in Analogie zu den Ergebnissen, die mit der Spinsonde CAT-1 erzielt wurden, nach einer Inkubationsdauer von 24 Stunden folgende Reihenfolge der maximalen Signalintensitäten: Liposomen aus Sojalipid mit fluiden Membranen < Liposomen aus partialsynthetischem Lipid mit fluiden Membranen < Liposomen aus Sojalipid mit rigiden Membranen < Liposomen aus partialsynthetischem Lipid mit rigiden Membranen.

Damit sind für eine effektive Penetration der Spinsonden in die Haut nach 24 Stunden Liposomen mit rigiden Membranen besser geeignet als Liposomen mit fluiden Membranen, und solche aus partialsynthetischen Grundlagen besser als Liposomen aus Sojabohnenlipiden. Im Unterschied zu den Untersuchungen mit CAT-1 führt die Applikation von TEMPOL in Liposomen mit rigiden Lipidmembranen in vorbehandelten Hautproben generell zu höheren Signalintensitäten, als die Applikation in Liposomen mit fluiden Lipidmembranen.

Nachdem der Einfluss der Liposomengrundlage auf die maximale Signalintensität von TEMPOL in der Haut untersucht wurde, sollte sich nachfolgend ein Vergleich mit den topischen Zubereitungen Lösung, hydrophile Salbe und Mikroemulsion anschließen. Aus dem Vergleich sollten Aussagen zur Verstärkung der Spinsondenpenetration durch Liposomen abgeleitet werden. Darüber hinaus sollte untersucht werden, ob Liposomen die Spinsonde stärker in den oberen Hautschichten binden können, als die konventionellen Formulierungen.

Nach der Applikation von TEMPOL in ethanolischer Lösung auf Hautproben ohne Enzymhemmung wurden bereits nach 3,5 Stunden ESR-Signale mit vergleichsweise hohen Intensitäten registriert (Abb. 104). Die Intensität nahm in den folgenden 3,5 Stunden der Untersuchung zunächst zu, bevor sie bis zum Ende des Versuchs wieder abfiel. Im Gegensatz zur Applikation von TEMPOL in Liposomen resultierten aus der epikutanen Applikation von TEMPOL in Lösung keine Verteilungsprofile mit ausgeprägten Signalmaxima. Vielmehr lag im Bereich der Epidermis nach 3,5 bzw. 7,0 Stunden eine gleichmäßige Verteilung der Signalintensität vor. Die Penetrationsfront lag eine Stunde nach der epikutanen Applikation der Zubereitung bereits in einer Tiefe von 1,14 mm und verschob sich im weiteren Verlauf der Untersuchung in eine Tiefe von 1,29 mm (3,5 Stunden) bzw. 1,53 mm (7,0 Stunden).

Nach der epikutanen Applikation der Lösung auf Hautproben mit Enzymhemmung nahm die maximale Signalintensität in den ersten 7,0 Stunden der Untersuchung zu, bevor sie bis zum Ende der Untersuchung nach 24 Stunden wieder abfiel. In Hautproben mit Enzymhemmung kam es zur Ausprägung von Signalmaxima, die in einer Tiefe von 0,53 mm (3,5 Stunden)

bzw. 0,36 mm (7,0 Stunden) lagen. Das Auftreten der Maxima kann durch die mit zunehmender Penetrationstiefe abnehmenden Linienbreiten der ESR-Spektren von TEMPOL und die sich daraus ergebenden Effekte begründet werden. Die Penetrationsfront der Spinsonde lag nach einer Stunde bzw. 3,5 Stunden in einer Tiefe von 1,76 mm und verschob sich bis zum Ende der Untersuchung in eine Tiefe von 2,10 mm.

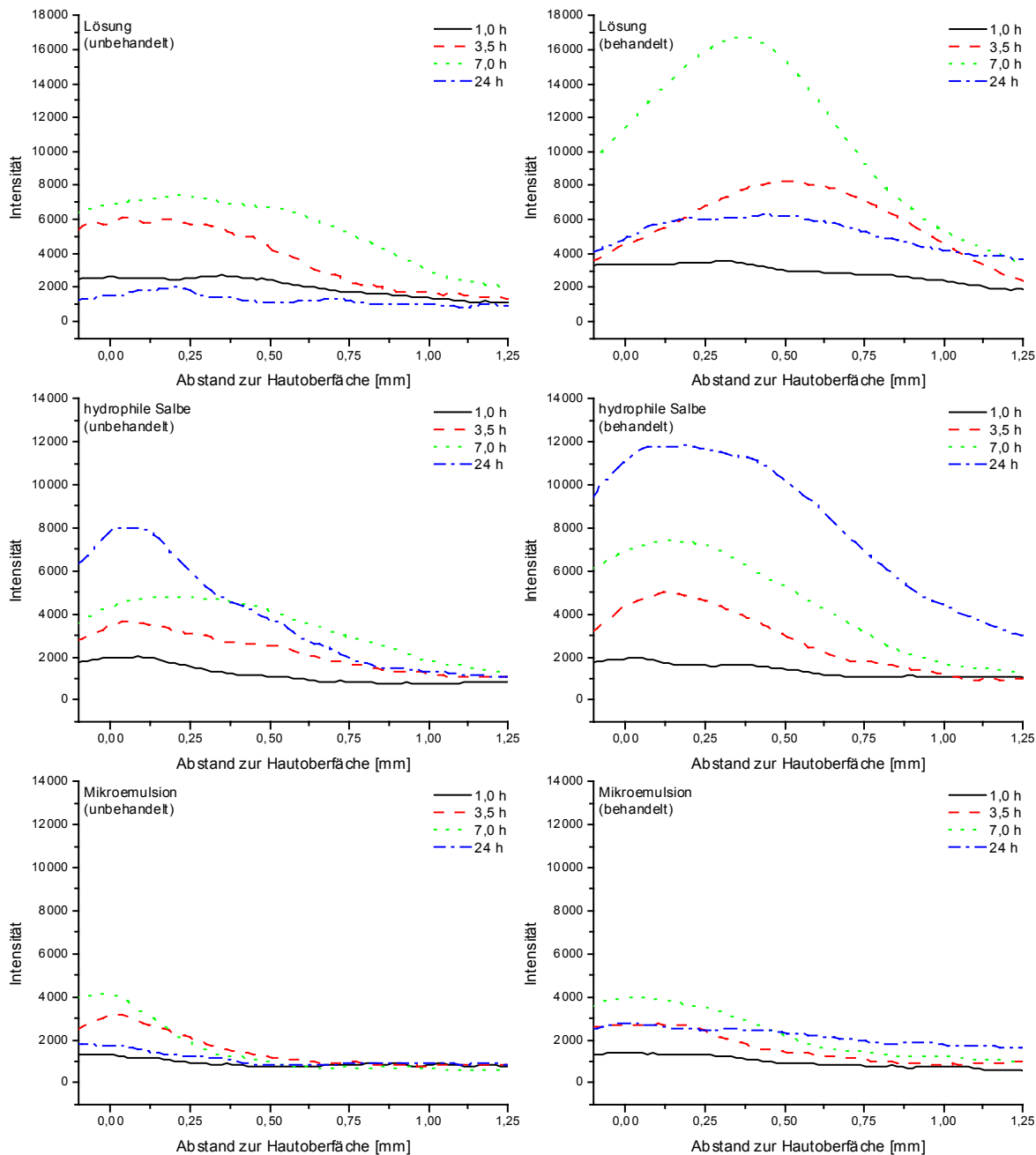


Abb. 104 Signalintensität von TEMPOL in Hautproben ohne (links) und mit (rechts) Enzymhemmung in Abhängigkeit vom Abstand zur Hautoberfläche 1,0; 3,5; 7,0 und 24 Stunden nach epikutaner Applikation von TEMPOL in Lösung, hydrophiler Salbe bzw. Mikroemulsion ($n = 3$)

Im Vergleich zu Liposomen führte die epikutane Applikation von TEMPOL in Lösungen zu deutlich höheren Signalintensitäten in der Haut. Im Gegensatz zu der Lösung erreicht die Spinsonde nach der Applikation in Liposomen jedoch schneller tiefer liegende Hautschichten, wie ein Vergleich der Penetrationstiefen zeigt. Daher kann zwar nicht von einem penetrationsfördernden Einfluss der Liposomen in Bezug auf die Spinsondenmenge, die in die Haut penetriert, wohl aber von einem penetrationsfördernden Einfluss in Bezug auf die Geschwindigkeit ausgegangen werden, mit der die Spinsonde in tiefere Hautschichten vordringt. Aus dem Vergleich der Signalintensitäten von TEMPOL in Hautproben ohne Enzymhemmung wird deutlich, dass Liposomen zu einer verstärkten Bindung der Spinsonde in den oberen Hautschichten führen und daher im Vergleich zu Lösungen einen größeren Depoteffekt besitzen.

Nach der Applikation von TEMPOL in hydrophiler Salbe auf Hautproben ohne Enzymhemmung nahm die maximale Signalintensität in der Zeit von einer Stunde nach der Applikation bis zum Ende der Untersuchung kontinuierlich zu. Die Maxima der Absorptionssignale lagen nach 3,5 bzw. 24 Stunden in einer Tiefe von 0,05 mm. Dagegen wurde für das Maximum, das sich nach 7,0 Stunden ausgebildet hat, eine Tiefe von 0,21 mm bestimmt. Die Penetrationsfront der Spinsonde verschob sich aus einer Tiefe von 0,58 mm (1,0 Stunde) in Tiefen von 1,24 mm (3,5 Stunden), 1,53 (7,0 Stunden) bzw. 1,23 mm (24 Stunden).

Nach der Applikation von TEMPOL in hydrophiler Salbe auf Hautproben mit Enzymhemmung nahm die Signalintensität der Spinsonde in der Haut ebenfalls im gesamten Untersuchungszeitraum zu (Abb. 104). Die Maxima der Signalintensitäten lagen in einem Bereich von 0,14 mm bis 0,17 mm. Die Penetrationsfront der Spinsonde lag nach einer Stunde in einer Tiefe von 0,75 mm und verschob sich nach 3,5 bzw. 7,0 Stunden in eine Tiefe von 1,04 mm bzw. 1,42 mm. Nach einer Inkubationsdauer von 24 Stunden konnte die Lage der Penetrationsfront nicht mehr bestimmt werden, da in allen Hautschichten ESR-Signale vorlagen, deren Intensität deutlich größer war als die Intensität des Grundsignals.

Im Vergleich zu Liposomen führt die epikutane Applikation von TEMPOL in hydrophiler Salbe auf Hautproben ohne und mit Enzymhemmung in den ersten 3,5 Stunden der Untersuchung zu geringeren Signalintensitäten. Die 7,0 Stunden nach der Applikation registrierten maximalen Signalintensitäten von TEMPOL nach der Applikation beider Zubereitungen sind miteinander vergleichbar. Im Unterschied zur hydrophilen Salbe resultieren aus der epikutanen Applikation von TEMPOL in Liposomen auf Hautproben mit Enzymhemmung jedoch

deutlich größere Signalintensitäten in tieferen Hautschichten ($> 0,5$ mm). Liposomen haben daher im Vergleich zur hydrophilen Salbe innerhalb der ersten 7,0 Stunden der Untersuchung einen penetrationsfördernden Effekt für die Spinsonde TEMPOL. Dieser penetrationsfördernde Effekt wird auch durch die Auswertung der Penetrationstiefen deutlich. Danach konnten bereits 3,5 Stunden nach der epikutanen Applikation der Spinsonde in Liposomen in allen Hautschichten ESR-Signale registriert werden, während dies erst 24 Stunden nach der epikutanen Applikation der Spinsonde in hydrophiler Salbe möglich war. Im Vergleich zu Liposomen führt die verwendete hydrophile Salbe jedoch zu einem größeren Depoteffekt für TEMPOL. Dies wird dadurch deutlich, dass 24 Stunden nach der epikutanen Applikation der Spinsonde in hydrophiler Salbe deutlich größere Signalintensitäten in den oberen Hautschichten registriert werden konnten.

Nach der epikutanen Applikation von TEMPOL in Mikroemulsion auf Hautproben ohne und mit Enzymhemmung konnten nach 3,5 bzw. 7,0 Stunden ESR-Signale von geringer Intensität registriert werden (Abb. 104). Die Signalintensität nahm bis zum Ende der Untersuchung nach 24 Stunden ab. Die Maxima der Verteilungsprofile der Signalintensitäten waren in Hautproben ohne Enzymhemmung unmittelbar an der Hautoberfläche lokalisiert. Eine Stunde nach der Applikation der Mikroemulsion lag die Penetrationsfront der Spinsonde in einer Tiefe von nur 0,2 mm und verschob sich bis in eine maximale Tiefe von 0,51 mm nach 7,0 h. In Hautproben mit Enzymhemmung konnten keine ausgeprägten Maxima der Verteilungsprofile der Signalintensitäten registriert werden. Hier lagen 3,5 bzw. 7,0 Stunden nach der Applikation der Mikroemulsion relativ gleichmäßig verteilte Signalintensitäten im Bereich der Epidermis vor. Für die Penetrationsfront der Spinsonde wurde eine Stunde nach der Applikation eine Tiefe von 0,39 mm bestimmt. Nach 3,5 bzw. 7,0 Stunden lag die Spinsonde in einer Tiefe von 0,77 mm bzw. 1,13 mm vor. Bis zum Ende der Untersuchung penetrierte die Spinsonde in alle Hautschichten.

Im Vergleich zu der verwendeten Mikroemulsion weisen Liposomen einen klaren penetrationsfördernden Effekt für die Spinsonde TEMPOL auf. Dieser führte dazu, dass zu allen Zeitpunkten sowohl in Hautproben mit als auch in Hautproben ohne Enzymhemmung deutlich größere Signalintensitäten nach der Applikation der Spinsonde in Liposomen registriert werden konnten. Der Vergleich von Hautproben ohne Enzymhemmung zeigte zudem, dass Liposomen im Vergleich zur Mikroemulsion einen erhöhten Depoteffekt für die Spinsonde

aufweisen.

TEMPOL-benzoat. Nach der epikutanen Applikation von TEMPOL-benzoat in Liposomen und den ausgewählten topischen Zubereitungen konnten in Hautproben ohne und mit Enzymhemmung nur Spuren von ESR-Signalen registriert werden. Dafür könnte eine Anreicherung der Spinsonde in der Lipidphase zwischen den Korneozyten und eine stark verminderte Abgabe der Spinsonde aus diesem Depot in tiefere Hautschichten verantwortlich gewesen sein. Dieses Verhalten ist für Arzneistoffe mit sehr hohem Lipid-/Wasser-Verteilungskoeffizienten bereits nachgewiesen worden (vgl. 2.2.1). Ein weiterer Grund für die geringen Signalintensitäten könnte die Immobilisierung der im Vergleich zu CAT-1 und TEMPOL relativ großen Spinsonde im Bereich des Stratum corneum gewesen sein, in deren Folge die Linienbreite der ESR-Signale stark zunimmt und die Amplitude der Absorptionssignale sinkt. Daneben ist aber auch eine verminderte Hautpenetration von TEMPOL-benzoat denkbar.

Da aufgrund der geringen Signalintensitäten weiterführende Auswertungen der ESR-Tomogramme nicht durchgeführt werden konnten, wurde der Versuchsansatz mit TEMPOL-benzoat aufgegeben.

3.5.2 Veränderungen der Polarität der Spinsondenumgebung in der Haut nach epikutaner Applikation von Liposomen

Im folgenden sollte die Polarität der Mikroumgebung von CAT-1 und TEMPOL in der Haut anhand der Hyperfeinaufspaltung (aN) ortsabhängig charakterisiert werden. Dabei war von besonderem Interesse, ob die epikutane Applikation der unter 4.5.1 verwendeten Liposomen und konventionellen topischen Zubereitungen zu einer nachweisbaren Veränderung der Hyperfeinaufspaltung^h führt. Die ortsabhängigen Hyperfeinaufspaltungen wurden aus ESR-Tomogrammen bestimmt, die 3,5; 7,0 bzw. 24 Stunden nach der epikutanen Applikation von

^h Auf die Unterscheidung von isotropen und anisotropen Anteilen der Hyperfeinkopplungskonstante wurde verzichtet

CAT-1 bzw. TEMPOL-beladenen Zubereitungen auf Hautproben ohne und mit Enzymhemmung unter 3.1.5 aufgezeichnet wurden. Auf die Auswertung der Tomogramme, die eine Stunde nach der epikutanen Applikation der Zubereitungen registriert wurden, wurde aufgrund der geringen Signal-Rausch-Verhältnisse verzichtet.

Darüber hinaus sollte durch den Vergleich der Hyperfeinaufspaltungen in Hautproben ohne und mit Enzymhemmung überprüft werden, ob durch N-Ethylmaleinimid, das zur Hemmung von Thiolgruppen-abhängigen Enzymen in der Haut verwendet wurde, die Polarität in den Hautproben verändert wird.

Zur Auswertung der Hyperfeinaufspaltung in der Haut wurde die Punktematrix der ESR-Tomogramme in individuelle Spektren zerlegt, denen jeweils eine bestimmte Tiefe, d. h. ein bestimmter Abstand zur Hautoberfläche, zugeordnet wurde (vgl. 5.2.1). Aus diesen Spektren wurde dann die Hyperfeinaufspaltung von CAT-1 bzw. TEMPOL in Abhängigkeit von den epikutan applizierten topischen Zubereitungen entnommen. Aufgrund der schlechten Signal-Rausch-Verhältnisse der Spektren wurde auf die Unterscheidung zwischen den Ergebnissen einzelner Liposomen-Zubereitungen und deren Abhängigkeit von der Lipidgrundlage verzichtet. Statt dessen wurden aus den Hyperfeinaufspaltungen der jeweiligen Spinsonde, ungeachtet der Lipidgrundlage der Liposomen, die Mittelwerte und die zugehörigen Standardabweichungen ortsabhängig berechnet.

CAT-1. Nach der Applikation von CAT-1 in Liposomen auf Hautproben ohne Enzymhemmung wurden während des gesamten Versuchszeitraums ESR-Signale von sehr geringer Intensität registriert (vgl. 3.5.1). Die Signalintensität in den entsprechenden ESR-Tomogrammen war für die Bestimmung der ortsabhängigen Hyperfeinaufspaltung nicht ausreichend (Abb. 105).

Dagegen konnten nach der Applikation von CAT-1 in Liposomen auf Hautproben mit Enzymhemmung ESR-Signale registriert werden, deren Signalintensitäten zur ortsabhängigen Bestimmung der Hyperfeinaufspaltung geeignet waren. Für die Spinsonde CAT-1 wurde eine mit zunehmendem Abstand von der Hautoberfläche ansteigende Hyperfeinaufspaltung berechnet. Der für die Hautoberfläche bestimmte Wert von a_N liegt in einem Bereich von 1,492 bis 1,504 mT und nimmt mit steigendem Abstand zur Hautoberfläche zu. Ab einer

Tiefe von ca. 0,45 mm pendelt der Wert der Hyperfeinaufspaltung um einen Mittelwert von etwa 1,515 mT.

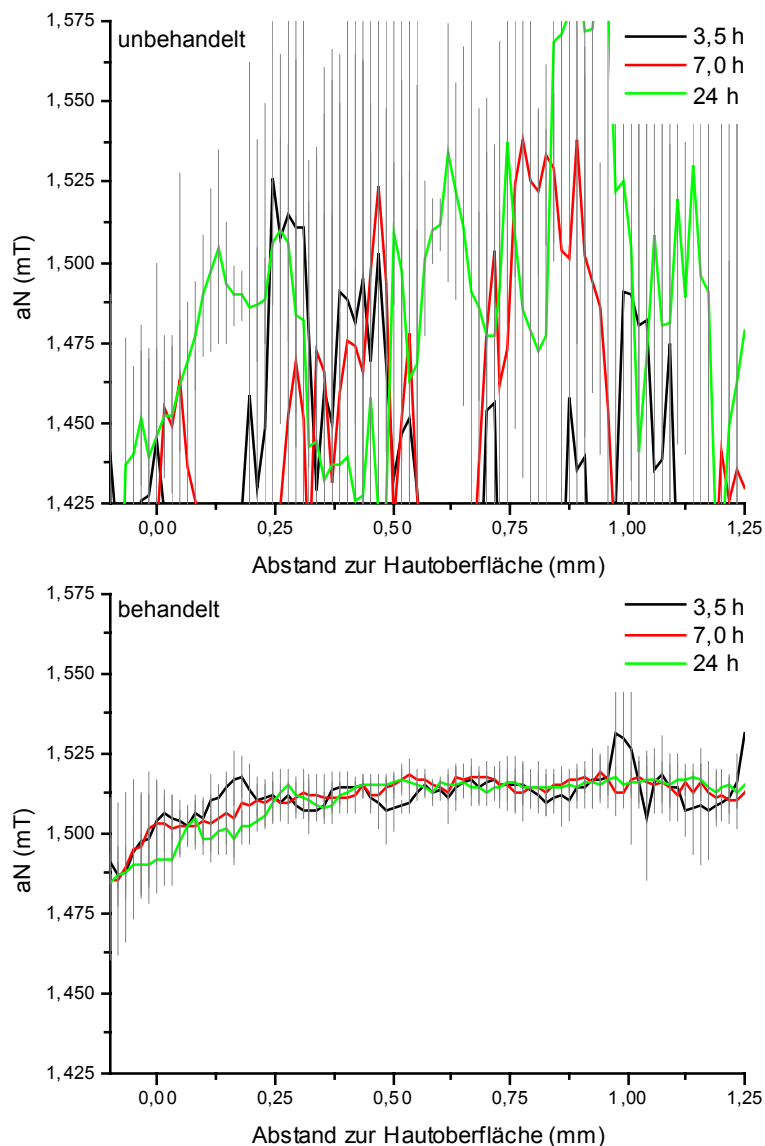


Abb. 105 Aufspaltungsprofile von CAT-1 in unbehandelten (oben) und mit NEM vorbehandelten Hautproben (unten) 3,5; 7,0 und 24 Stunden nach epikutaner Applikation von CAT-1 in Liposomen ($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

Mit Hilfe von ESR-Spektren, aufgenommen ohne Feldgradienten, wurde für CAT-1 in einer Phosphatpuffer-Lösung (pH = 7,4) ein Hyperfeinaufspaltungswert von ca 1,540 mT bestimmt. Der Vergleich mit der Haut zeigt, dass die Mikroumgebung der Spinsonde in der Haut insgesamt apolarer ist als in der wässrigen Lösung. Zwischen den Aufspaltungsprofilen, die aus den nach 3,5; 7,0 und 24 Stunden aufgezeichneten Tomogrammen für CAT-1 in der Haut

berechnet wurden, konnten nur sehr geringe Unterschiede festgestellt werden. Daher kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass die Umgebungspolarität der Spinsonde in diesem Zeitraum keinen Veränderungen unterlag.

Unter 3.4.1 wurde eine Methode zur nicht invasiven Abbildung von Hautschichten durch die ESR-Tomografie entwickelt. Die Unterscheidung der Hautschichten erfolgte dabei anhand der Hyperfeinaufspaltung der Spinsonde ^{15}N -TEMPO. Die ermittelten Aufspaltungswerte, die für den Bereich der Epidermis bzw. oberen Dermis bestimmt wurden, waren kleiner als die Aufspaltung der Spinsonde in wässriger Lösung (Abb. 89 und 90). Dadurch wird die anhand der Aufspaltung von CAT-1 gewonnene Erkenntnis bestätigt, dass die Mikropolarität der Spinsondenumgebung in der Haut weniger polar ist als in wässriger Lösung. Aus dem Aufspaltungsprofil von ^{15}N -TEMPO in der Haut ist weiterhin ersichtlich, dass die Spinsonde im Bereich der Epidermis eine geringere Aufspaltung aufweist als im Bereich der oberen Dermis. Die im Bereich der Epidermis ebenfalls verminderte Aufspaltung der Spinsonde CAT-1 ist daher wahrscheinlich nicht auf eine „Lipophilisierung“ der oberen Hautschichten durch Bestandteile von Liposomen, sondern auf die in der Haut vorhandenen Polaritätsunterschiede der einzelnen Hautschichten zurückzuführen.

Ob der mit zunehmendem Abstand zur Hautoberfläche verbundene Anstieg der Hyperfeinaufspaltung von CAT-1 auf Veränderungen der Umgebungspolarität durch die epikutan applizierten Liposomen oder auf die unterschiedlichen Polaritäten der Hautschichten (vgl. 3.4.1) zurückzuführen ist, sollte daher nachfolgend untersucht werden. Dazu wurde, die Hyperfeinaufspaltungen von CAT-1 nach der epikutanen Applikation in Phosphatpuffer bestimmt.

Nach der Applikation der CAT-1-Lösung auf Hautproben ohne Enzymhemmungen sind die Signalintensitäten der registrierten ESR-Signale innerhalb der ersten 3,5 Stunden der Untersuchung zur Bestimmung der Hyperfeinaufspaltungen nur bedingt geeignet. Dagegen konnte aus den nach einer Inkubationsdauer von 7,0 bzw. 24 Stunden aufgezeichneten ESR-Tomogrammen ein Hyperfeinaufspaltungsprofil berechnet werden (Abb. 106). Die Aufspaltungsprofile der Spinsonde sind durch große Schwankungen gekennzeichnet. Diese sind auf die geringen Signal-Rausch-Verhältnisse der zugrunde liegenden ESR-Tomogramme zurückzuführen. Ein mit zunehmendem Abstand von der Hautoberfläche auftretender Anstieg der Hyperfeinaufspaltung konnte zwar nicht eindeutig festgestellt werden, kann aber aufgrund der großen Schwankungen der Aufspaltungswerte nicht ausgeschlossen werden.

Die Aufspaltungsprofile von CAT-1 in Hautproben mit Enzymhemmung weisen in den ersten 7,0 Stunden der Untersuchung einen Anstieg der Aufspaltung mit zunehmendem Abstand von der Hautoberfläche auf. Innerhalb dieses Zeitraums unterliegen die Aufspaltungswerte der Spinsonde in der Epidermis erheblichen Schwankungen. Diese sind auf die im Vergleich zur Dermis geringeren Signalintensitäten und die damit verminderte Bestimmungsgenauigkeit der Hyperfeinaufspaltung zurückzuführen. Die Aufspaltungswerte der Spinsonde pendeln im Bereich der Dermis um einen Mittelwert von ca. 1,515 bis 1,517 mT. Der mit dem Übergang von der Epidermis zur Dermis verbundene Anstieg der Hyperfeinaufspaltung konnte nach einer Inkubationsdauer von 24 Stunden nicht mehr nachgewiesen werden. Weiterhin wurde festgestellt, dass der Mittelwert der Aufspaltung im Vergleich zu den anderen Hautproben erhöht ist (1,523 mT). Dieser Befund deutet auf eine erhöhte Polarität in den Hautproben hin, die nach 24 Stunden vermessen wurden. Gründe für die Veränderung der Polarität können jedoch nicht angegeben werden. Daher sollte sich zur abschließenden Beurteilung dieses Ergebnisses zunächst ein Vergleich mit der Aufspaltung von TEMPOL in Hautproben mit Enzymhemmung anschließen (s.u.).

Die Aufspaltungsprofile von CAT-1, das in Liposomen bzw. in Phosphatpuffer epikutan appliziert wurde, stimmen innerhalb der ersten 7,0 Stunden weitgehend in ihrem Verlauf überein. Auch die für die Dermis berechneten Mittelwerte der Hyperfeinaufspaltung sind nahezu identisch. Es kann daher die Schlussfolgerung gezogen werden, dass die Bestandteile epikutan applizierter Liposomen nicht zu einer Veränderung der Aufspaltung der Spinsonde und damit der Polarität in der Haut führen.

In den vorangegangenen Penetrationsuntersuchungen dienten neben der Lösung auch die konventionellen topischen Zubereitungen, d. h. hydrophile Salbe und Mikroemulsion, als Vergleich. Daher sollte nachfolgend untersucht werden, ob Bestandteile dieser topischen Zubereitungen zu einer Polaritätsänderung der Mikroumgebung von CAT-1 in der Haut führen.

Nach der epikutanen Applikation von CAT-1 in hydrophiler Salbe bzw. Mikroemulsion konnten für unbehandelte Hautproben aufgrund der geringen Intensität der ESR-Signale in der Haut keine Hyperfeinaufspaltungsprofile bestimmt werden. In Hautproben mit Enzymhemmung lagen erst nach einer Inkubationsdauer von 24 Stunden ESR-Signale vor, die zur ortsabhängigen Bestimmung der Hyperfeinaufspaltung geeignet waren. Die berechneten

Aufspaltungsprofile stimmen mit dem entsprechenden Aufspaltungsprofil von CAT-1, das in Liposomen appliziert wurde, nahezu überein. Daher kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass Bestandteile der hydrophilen Salbe bzw. Mikroemulsion, die in die Haut penetrieren, dort nicht zu einer Veränderung der Umgebungspolarität führen.

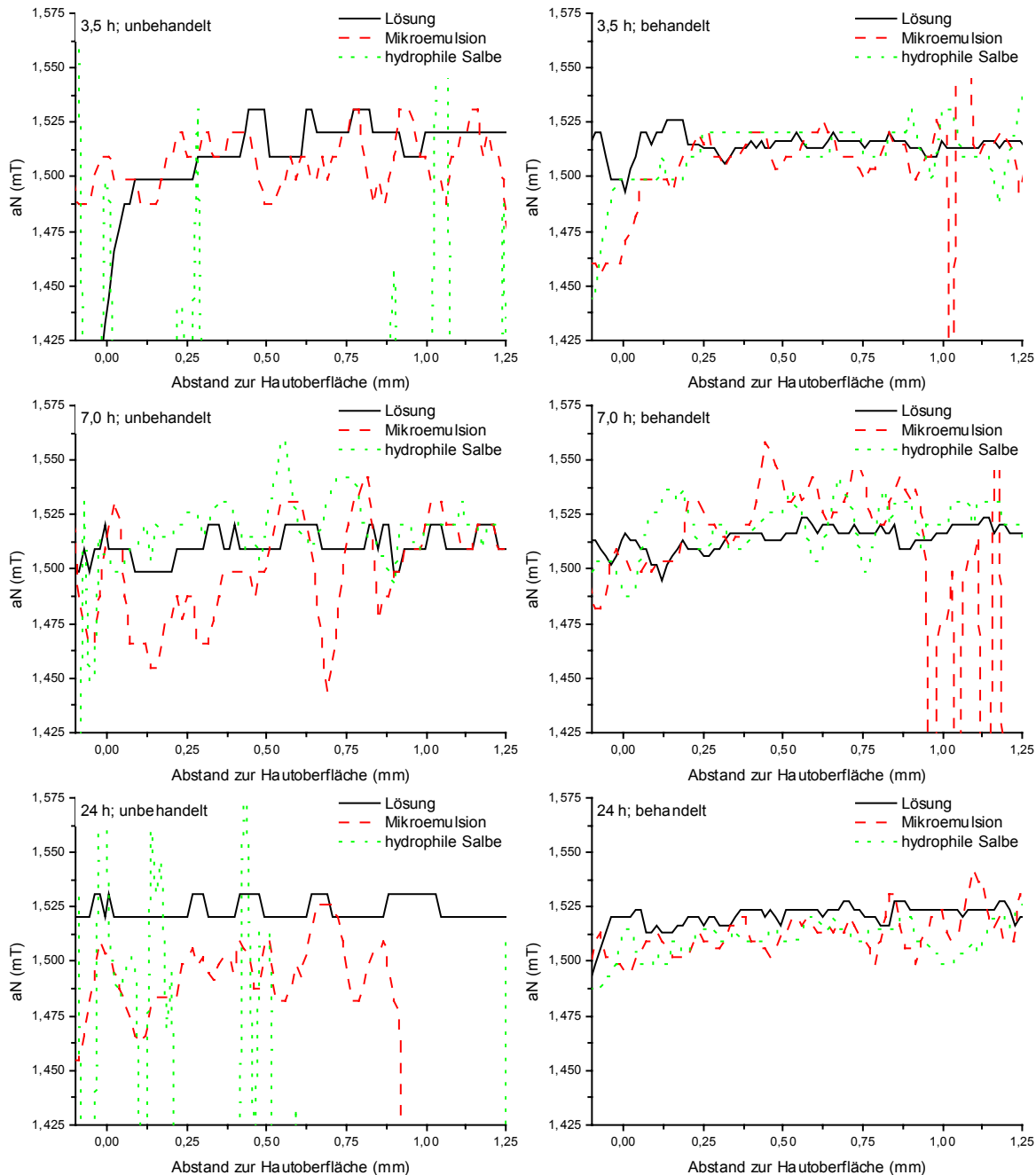


Abb. 106 Aufspaltungsprofile von CAT-1 in unbehandelten (links) und mit NEM vorbehandelten Hautproben (rechts) 1,0; 3,5; 7,0 und 24 Stunden nach epikutaner Applikation in Lösung, hydrophiler Salbe und Mikroemulsion ($n = 3$)

TEMPOL. Nach der epikutanen Applikation von TEMPOL in Liposomen auf Hautproben ohne Enzymhemmung wurden ESR-Signale registriert, deren Intensitäten zur ortsabhängigen Bestimmung der Hyperfeinaufspaltung ausreichend waren. Für die Spinsonde TEMPOL wurde eine mit zunehmendem Abstand von der Hautoberfläche ansteigende Hyperfeinaufspaltung bestimmt (Abb. 107). In Abhängigkeit von der Zeit ergaben sich Unterschiede im Verlauf der Aufspaltungsprofile in der Epidermis und in der oberen Dermis. Je kürzer die Inkubationsdauer der Hautproben nach der epikutanen Applikation der Zubereitung war, desto kleiner waren die Hyperfeinaufspaltungen in diesem Bereich. Während die Hyperfeinaufspaltung 3,5 Stunden nach der Applikation von TEMPOL an der Hautoberfläche ein Wert von 1,479 mT aufwies, stieg sie im weiteren Verlauf der Untersuchung auf 1,500 mT (7,0 Stunden) bzw. 1,513 mT (24 Stunden) an. Die Ursachen für diesen Effekt sind nicht bekannt. Denkbar sind Wechselwirkungen zwischen der Spinsonde und Hautbestandteilen, die mit der Inkubationsdauer und steigendem Wasserverlust aus den oberen Hautschichten zunehmen. Andererseits könnte aber auch ein durch den osmotischen Effekt begründeter Wassereinstrom in den oberen Hautschichten zu einer zunehmenden Solvatisierung der Spinsonde in der Haut und damit zum Anstieg der Hyperfeinaufspaltung führen.

Mit zunehmendem Abstand von der Hautoberfläche nahmen die Hyperfeinaufspaltungen, die aus den nach 3,5 bzw. 7,0 Stunden aufgezeichneten ESR-Tomogrammen bestimmt wurden, auf einen mittleren Wert von etwa 1,517 mT zu. Aus den nach 24 Stunden aufgezeichneten Tomogrammen konnte nur für den Bereich der Epidermis ein Aufspaltungsprofil bestimmt werden, da in tieferen Hautschichten die Signalintensitäten zu gering waren. Alle Aufspaltungswerte von TEMPOL in unbehandelten Hautproben lagen unter dem Wert, der aus cw-spektroskopisch registrierten Spektren für die Spinsonde in einer Lösung mit Phosphatpuffer bestimmt wurde (1,566 mT). Dadurch wird die mit CAT-1 gewonnene Erkenntnis bestätigt, dass die Polarität der Mikroumgebung der Spinsonde in der Haut geringer ist als die in wässriger Lösung. Da die Spinsonde TEMPOL amphiphil ist, konnte ihre Hyperfeinaufspaltung auch in dem apolaren Lösungsmittel Miglyol als weiterem Bezugssystem bestimmt werden. Sie beträgt ca. 1,426 mT und ist damit deutlich geringer als die kleinsten Aufspaltungswerte der Spinsonde in der Haut.

Nach der Applikation von TEMPOL in Liposomen auf Hautproben mit Enzymhemmung

zeigten die Aufspaltungsprofile der Spinsonde einen ähnlichen Verlauf wie in Hautproben ohne Enzymhemmung. An der Hautoberfläche wurde nach 3,5 Stunden ein Aufspaltungswert von 1,508 mT bestimmt, der im weiteren Verlauf der Untersuchung auf 1,521 mT (7,0 Stunden) bzw. 1,529 mT (24 Stunden) zunahm.

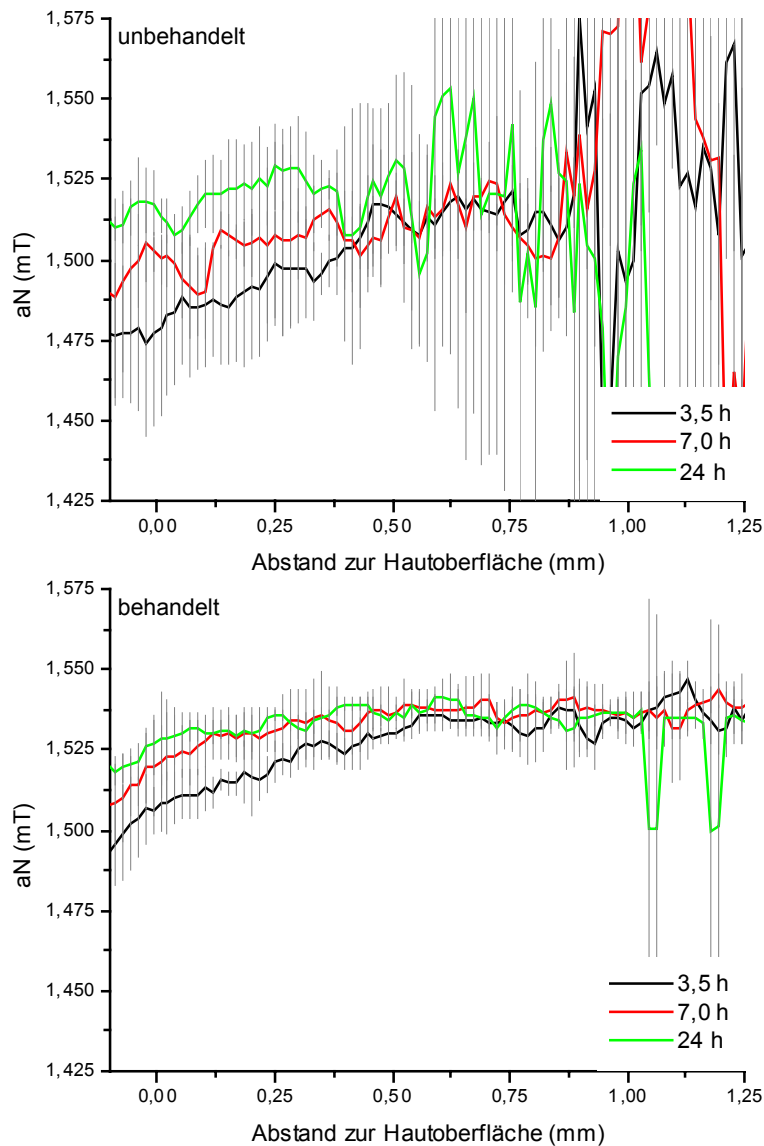


Abb. 107 Aufspaltungsprofile von TEMPOL in unbehandelten (oben) und mit NEM vorbehandelten Hautproben (unten) 3,5; 7,0 und 24 Stunden nach epikutaner Applikation von TEMPOL in Liposomen ($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

Der mittlere Aufspaltungswert der Spinsonde in tieferen Hautschichten betrug für alle Aufspaltungsprofile 1,537 mT. Damit waren die Aufspaltungswerte der Spinsonde in Hautproben mit Enzymhemmung im Vergleich zu Hautproben ohne Enzymhemmung an der Haut-

oberfläche ebenso erhöht wie die Aufspaltungswerte in tieferen Hautschichten. Aus dem Vergleich geht hervor, dass die Vorbehandlung der Haut mit N-Ethylmaleinimid zu einer Erhöhung der Polarität in allen Hautschichten führt. Durch die Vorbehandlung der Hautproben mit N-Ethylmaleinimid wird jedoch nicht nur die Polarität der Haut erhöht, sondern auch deren zeitabhängige Veränderung vermindert. Dies wird durch die zeitabhängigen Unterschiede zwischen den Aufspaltungsprofilen von TEMPOL belegt, die in Hautproben mit Enzymhemmung geringer sind als in Hautproben ohne Enzymhemmung.

Durch den Vergleich der Aufspaltungsprofile von TEMPOL, das in Liposomen bzw. Lösungen epikutan appliziert wurde, sollte ebenso wie für CAT-1 überprüft werden, ob die Polarität in der Haut durch Bestandteile von Liposomen verändert wird.

Ein Vergleich der Aufspaltungsprofile von TEMPOL in unbehandelten Hautproben konnte aufgrund der großen Schwankungen der Aufspaltungswerte, die aus den geringen Signal-Rausch-Verhältnissen der ESR-Tomogramme resultieren, nicht vorgenommen werden (Abb. 108). Die Aufspaltungsprofile von TEMPOL in Hautproben mit Enzymhemmung haben nach der Applikation der Spinsonde in Lösungen bzw. Liposomen den gleichen Verlauf. Das Ergebnis zeigt, dass der Anstieg der Hyperfeinaufspaltung mit zunehmendem Abstand von der Hautoberfläche auf Polaritätsunterschiede in der Haut und nicht auf Veränderungen der Polarität durch Bestandteile von Liposomen zurückzuführen ist.

Durch einen Vergleich der Aufspaltungsprofile von TEMPOL in Hautproben nach der Applikation in Lösung, hydrophiler Salbe und Mikroemulsion sollte überprüft werden, ob die konventionellen topischen Zubereitungen im Gegensatz zu Liposomen zu einer Veränderung der Polarität in der Haut führen.

Auf einen Vergleich der Aufspaltungsprofile von TEMPOL, die nach der epikutanen Applikation in hydrophiler Salbe, Mikroemulsion bzw. Lösung auf Hautproben ohne Enzymhemmung registriert wurden, wurde aufgrund der großen Schwankungen der Hyperfeinaufspaltungswerte verzichtet (Abb. 108).

In Hautproben mit Enzymhemmung haben die Aufspaltungsprofile von TEMPOL nach der Applikation in Mikroemulsion den gleichen Verlauf wie nach der Applikation in Lösung. Eine Veränderung der Polarität in der Haut durch die epikutan applizierte Mikroemulsion kann damit ausgeschlossen werden. Die Applikation der Spinsonde in hydrophiler Salbe führt

im Vergleich zur Applikation in Lösung in der Epidermis zu geringfügig niedrigeren Aufspaltungswerten. Eine Verminderung der Polarität bzw. die „Lipophilisierung“ der Haut durch Bestandteile der hydrophilen Salbe kann daher angenommen werden.

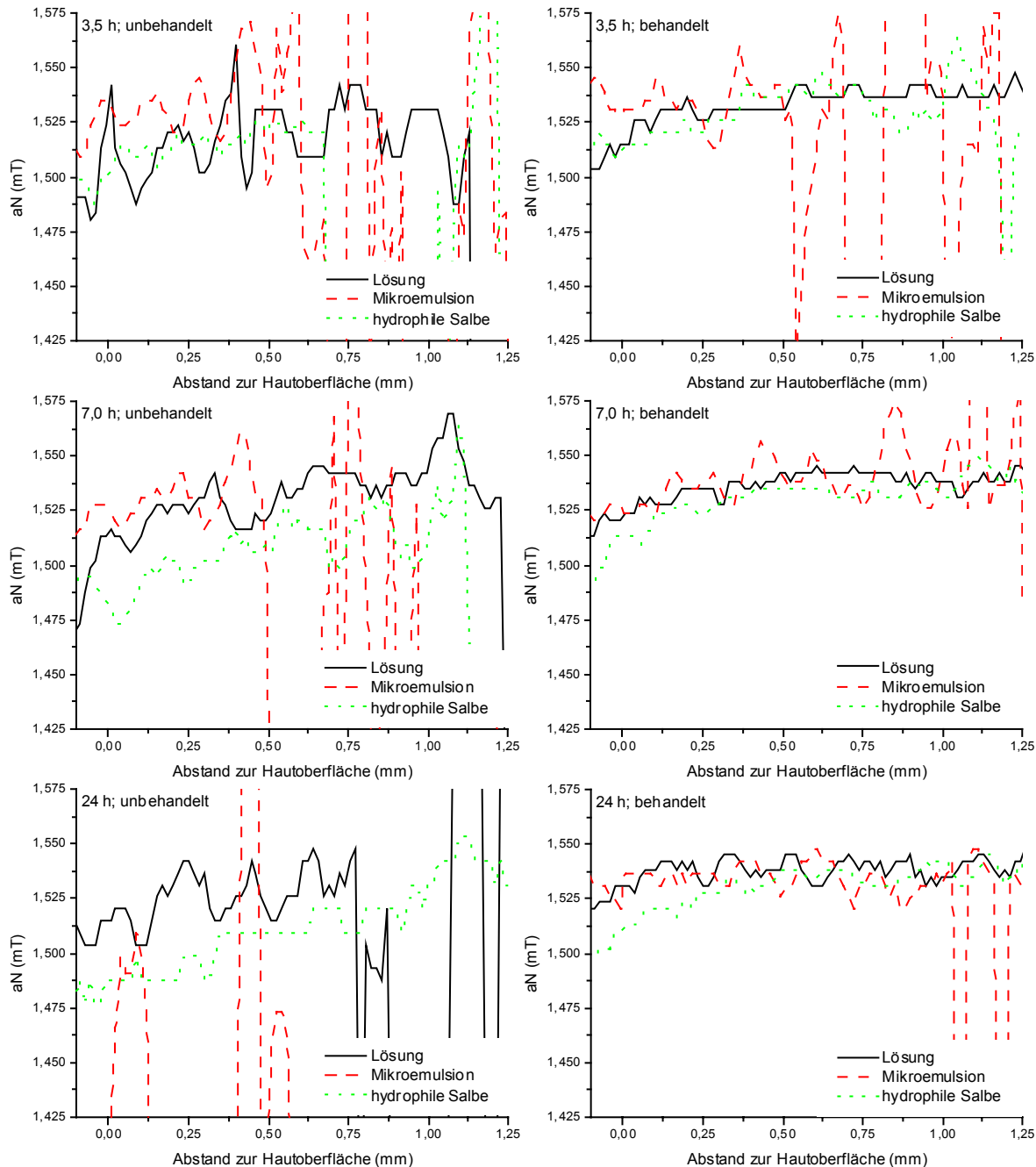


Abb. 108 Aufspaltungsprofile von TEMPOL in unbehandelten (links) und mit NEM vorbehandelten Hautproben (rechts) 1,0; 3,5; 7,0 und 24 Stunden nach epikutaner Applikation in Lösung, hydrophiler Salbe und Mikroemulsion (n = 3)

3.5.3 Ortsabhängige Mobilität von CAT-1 bzw. TEMPOL in der Haut

Im nachfolgenden Teil der Untersuchung sollte überprüft werden, ob mit Hilfe des Computerprogramms zur Berechnung von magnetischen Resonanzspektren (vgl. 3.4.2) die Bewegungsparameter der Spinsonden CAT-1 und TEMPOL aus ESR-Tomogrammen von Hautproben mit und ohne Enzymhemmung ortsabhängig berechnet werden können. Dazu wurden aus den unter 3.5.1 aufgezeichneten ESR-Tomogrammen zunächst individuelle Absorptionsspektren mit einem Abstand von -50, 0, 50, 100, 250, 500 μm zur Hautoberfläche entnommen, und diese anschließend abgeleitet und geglättet. Zur rechnergestützten Anpassung der Modellspektren an die so erzeugten Tomogramm-Spektren wurden die an Glycerol-Wasser-Mischungen entwickelten Parametersätze für die Kopplungskonstanten A_{xx} , A_{yy} , A_{zz} bzw. die g-Faktoren g_{xx} , g_{yy} , g_{zz} verwendet. Als Bewegungsparameter wurde der durch das Computerprogramm berechnete Logarithmus des „rotational diffusion tensor“ (RBAR) herangezogen (vgl. 3.4.2). In einem weiteren Schritt sollten aus RBAR nach Gleichung 7 die entsprechenden Rotationskorrelationszeiten der Spinsonde berechnet werden. Weiterhin sollte die Viskosität der Mikroumgebung von CAT-1 und TEMPOL in der Haut charakterisiert werden. Dazu wurden die Bewegungsparameter der Spinsonden in Glycerol-Wasser-Mischungen bestimmt und gegen die mit einem Ubbelohde-Viskosimeter bestimmte makroskopische Viskosität aufgetragen. Mit Hilfe der Funktionen der entsprechenden Kalibrierkurven sollten die RBAR-Werte in Viskositätswerte umgerechnet werden. Durch die Auswertung von ESR-Tomogrammen, die 3,5; 7,0 bzw. 24 Stunden nach der epikutanen Applikation von CAT-1 bzw. TEMPOL in Liposomen, hydrophiler Salbe und Mikroemulsion aufgenommen wurden, sollten Informationen zur zeitabhängigen Veränderung der Bewegungsparameter gewonnen werden. Der anschließende Vergleich mit den Bewegungsparametern der Spinsonden, die in Lösung epikutan appliziert wurden, sollte darüber hinaus zeigen, ob die Bestandteile der epikutan applizierten topischen Zubereitungen zu einer Veränderung der Mobilität von Spinsonden in der Haut führen. Von besonderem Interesse war dabei die Frage, ob der Depoteffekt von Liposomen für CAT-1 mit der Mobilität der Spinsonde in der Haut im Zusammenhang steht. Auf die Unterscheidung der Ergebnisse einzelner Liposomen-Zubereitungen in Abhängigkeit von deren Lipidgrundlagen wurde verzichtet. Vielmehr wurden die Ergebnisse der Liposomen-Zubereitungen, wie bereits in den vorangegangenen Kapiteln, zusammengefasst.

CAT-1. An die Spektren, die aus ESR-Tomogrammen in einem Abstand von -50, 0, 50, 100, 250 bzw. 500 μm zur Hautoberfläche entnommen wurden, konnten mit Hilfe des Computerprogramms Spektren mit vorher ermittelten Parametersätzen angepasst werden. Dadurch konnten die Bewegungsparameter der Spinsonde CAT-1 ortsabhängig bestimmt und das Spektrum der Informationen, die aus ESR-Tomogrammen zugänglich sind, deutlich erweitert werden. Aus den Anpassungen an ESR-Spektren, die aus Tomogrammen von Hautproben ohne Enzymhemmung entnommen wurden, resultierten RBAR-Werte mit großen Standardabweichungen (Abb. 109).

Diese sind auf die geringen Intensitäten der ESR-Signale und die damit verbundenen, zum Teil unbefriedigenden Spektrenanpassungen zurückzuführen. Auf eine weiterführende Auswertung dieser Ergebnisse wurde daher verzichtet. Im Gegensatz dazu resultierten aus der Anpassung an Spektren, die aus ESR-Tomogrammen von Hautproben mit Enzymhemmung entnommen wurden, RBAR-Werte mit vergleichsweise geringen Standardabweichungen, die eine weiterführende Auswertung der Ergebnisse zuließen.

Die ortsabhängig berechneten RBAR-Werte von CAT-1 liegen in einem Bereich von 8,23 bis 8,62. Dies entspricht Rotationskorrelationszeiten von $5,94 \cdot 10^{-9}$ s bis $2,46 \cdot 10^{-9}$ s (Abb. 110). Damit ist die Mobilität von CAT-1 in allen Hautschichten geringer als in wässriger Lösung, in der ein RBAR-Wert von 9,13 bzw. eine Rotationskorrelationszeit von $7,40 \cdot 10^{-10}$ s bestimmt wurde. Mit zunehmendem Abstand von der Hautoberfläche nehmen die RBAR-Werte zu, und die Rotationskorrelationszeiten der Spinsonde entsprechend ab. Das Ergebnis lässt die Schlussfolgerung zu, dass die Bewegung der Spinsonde in den oberen Schichten der Epidermis (-50 bis 100 μm) stärker behindert wird als in den tieferliegenden Hautschichten.

Die Auswertung von Spektren aus ESR-Tomogrammen, die nach einer Inkubationsdauer von 3,5, 7,0 und 24 Stunden aufgezeichnet wurden, sollte über zeitabhängige Veränderungen der Spinsondenmobilität in der Haut Auskunft geben. Die RBAR-Werte und Rotationskorrelationszeiten von CAT-1, die aus den nach 3,5 bzw. 7,0 Stunden aufgezeichneten Tomogrammen bestimmt wurden, sind in allen untersuchten Hautschichten vergleichbar. Dagegen stimmen die RBAR-Werte und Rotationskorrelationszeiten der Spinsonde nach 24 Stunden zwar in einem Bereich von 250 μm bis 500 μm mit den Werten der früheren Zeitpunkte überein, unterscheiden sich jedoch in den oberen Schichten der Epidermis deutlich von diesen. Im oberen Bereich der Epidermis nehmen die nach 24 Stunden bestimmten RBAR-Werte bis auf

8,23 ab bzw. die Rotationskorrelationszeiten bis auf $5,94 \cdot 10^{-9}$ s zu. Das Ergebnis lässt daher die Schlussfolgerung zu, dass die Beweglichkeit der Spinsonde in den oberen Hautschichten mit zunehmender Inkubationsdauer abnimmt, und gleichzeitig der Unterschied der Spinsondenbeweglichkeit zwischen den oberen und unteren Hautschichten größer wird.

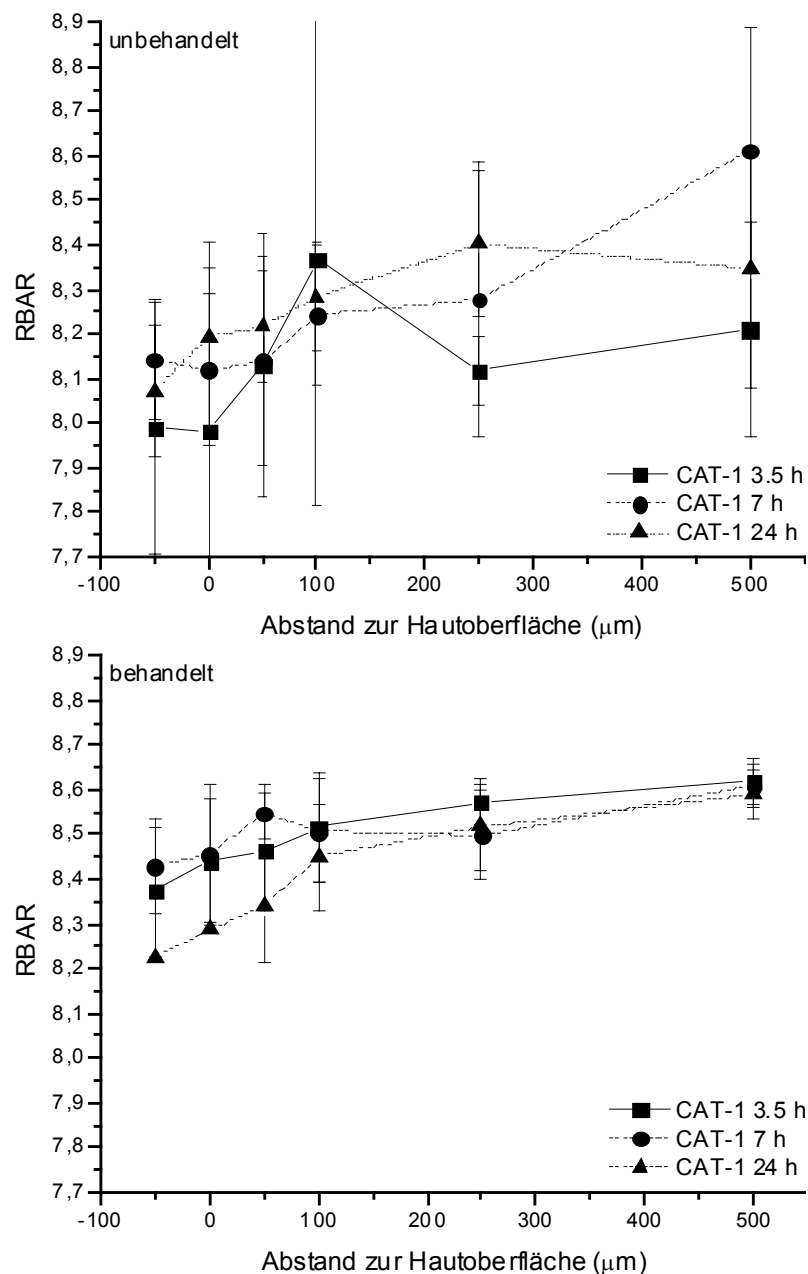


Abb. 109 RBAR-Werte von CAT-1 in unbehandelten (oben) und mit NEM vorbehandelten (unten) Hautproben in Abhängigkeit vom Abstand zur Hautoberfläche 3,5; 7,0 und 24 Stunden nach epikutaner Applikation von CAT-1 in Liposomen ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

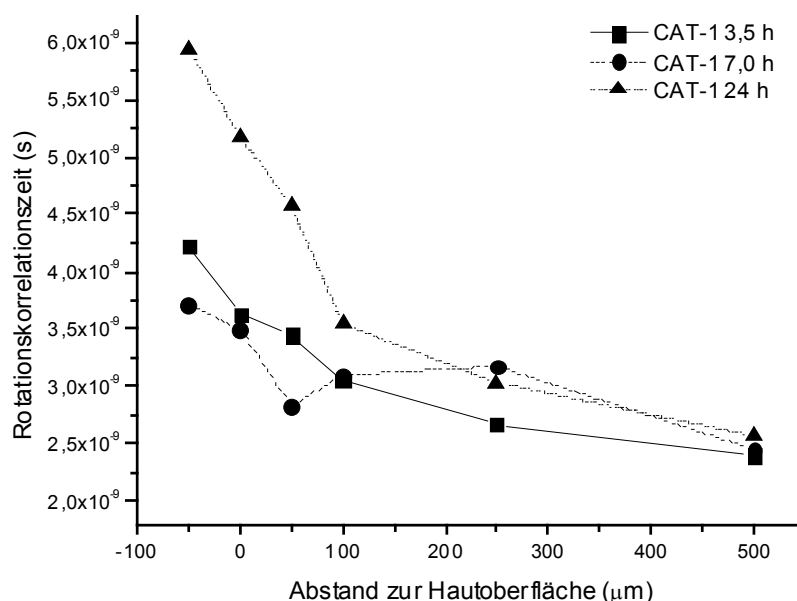


Abb. 110 Rotationskorrelationszeit von CAT-1 in Hautproben mit Enzymhemmung in Abhängigkeit vom Abstand zur Hautoberfläche 3,5; 7,0 und 24 Stunden nach epikutaner Applikation von CAT-1 in Liposomen

Mit Hilfe der an Glycerol-Wasser-Mischungen erstellten Kalibrierfunktion konnte aus den RBAR-Werten die Viskosität der Mikroumgebung von CAT-1 in der Haut berechnet werden (Abb. 111). Diese wird nachfolgend als Mikroviskosität bezeichnet.

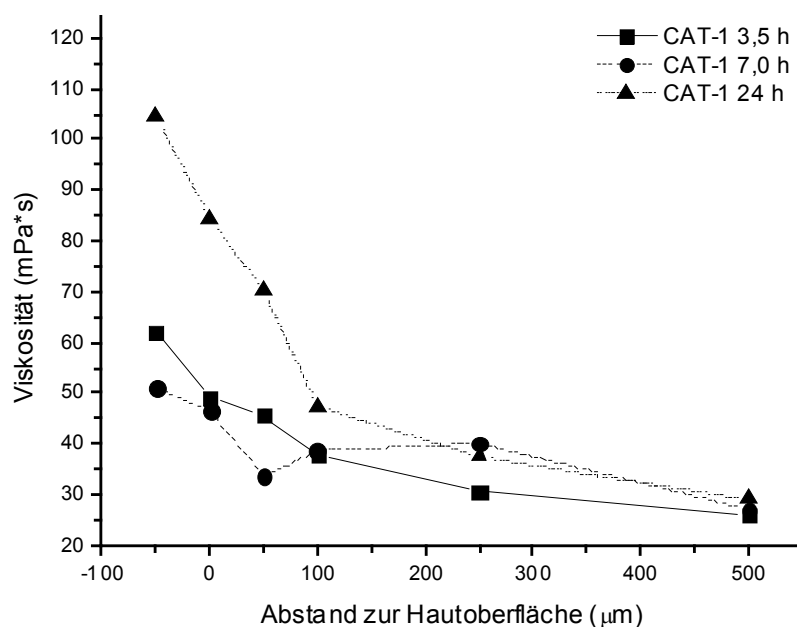


Abb. 111 Viskosität der Mikroumgebung von CAT-1 in Hautproben mit Enzymhemmung in Abhängigkeit vom Abstand zur Hautoberfläche 3,5; 7,0 und 24 Stunden nach epikutaner Applikation von CAT-1 in Liposomen

In einem Zeitbereich von 3,5 Stunden bis 7,0 Stunden nach der Applikation der Zubereitung auf die Haut lagen die Mikroviskositätswerte an der Hautoberfläche (50 μm) in einem Bereich von 51 bis 62 mPa·s und nahmen mit zunehmendem Abstand von der Hautoberfläche bis auf 26 mPa·s (500 μm) ab. Bis zum Ende der Untersuchung nach 24 Stunden stieg die Mikroviskosität an der Hautoberfläche bis auf 104 mPa·s an, blieb aber in tieferen Hautschichten nahezu unverändert.

Ob die zeitabhängigen Veränderungen der RBAR-Werte, Rotationskorrelationszeiten und Mikroviskositäten bzw. deren Unterschiede zwischen den oberen und unteren Hautschichten auf die Penetration von Bestandteilen aus Liposomen zurückzuführen sind, sollte nachfolgend überprüft werden. Dazu wurden die RBAR-Werte der Spinsonde CAT-1, die in Lösungen epikutan appliziert wurde, aus ESR-Tomogrammen bestimmt und mit den Ergebnissen der in Liposomen applizierten Spinsonde verglichen.

Die RBAR-Werte, die nach der Applikation von CAT-1 in Lösung aus den nach 3,5 h, 7,0 Stunden und 24 Stunden aufgezeichneten ESR-Tomogrammen bestimmt wurden, liegen in einem Bereich von 8,15 bis 8,47 (Abb. 112). Dabei sind die RBAR-Werte der Spinsonde in den oberen Hautschichten (-50 μm bis 100 μm) kleiner als in den tieferliegenden Hautschichten (250 μm bis 500 μm). Im Verlauf der Untersuchung ist ein Anstieg der RBAR-Werte zu verzeichnen.

Die aus den RBAR-Werten von CAT-1 berechnete Mikroviskosität betrug 3,5 Stunden nach der epikutanen Applikation in Lösung ca. 135 mPa·s an der Hautoberfläche (-50 μm). Mit zunehmendem Abstand von der Hautoberfläche sank sie bis auf 62 mPa·s ab (Abb. 113). Im Gegensatz dazu lag die Mikroviskosität in der Haut 7,0 bzw. 24 Stunden nach der Applikation von CAT-1 in Lösung in einem Bereich von 65 – 98 mPa·s und nahm mit zunehmendem Abstand von der Hautoberfläche bis auf ca. 45 – 54 mPa·s ab.

Die Ergebnisse belegen, dass die Mobilitätsunterschiede der Sonde zwischen den oberen und unteren Hautschichten nicht auf die Penetration von Liposomenbestandteilen zurückzuführen sind, sondern wahrscheinlich mit den in der Haut vorliegenden Strukturen verknüpft sind, die nachfolgend kurz erläutert wurden (vgl. 2.1.2. und 2.1.3.). Vom Stratum corneum ausgehend nimmt der in den Zellen vorhandene Keratinanteil über das Stratum granulosum bis zur Epidermis ab. In der gleichen Richtung steigt das Volumen der Hautzellen, wodurch sie ihre

abgeflachte Form verlieren. Mit dem zunehmenden Volumen der Zellen steigt auch der Wassergehalt der Hautschichten von ca. 5 bis 50 % im Stratum corneum auf über 75 % in der Epidermis an [125]. Im Gegensatz zur Epidermis besteht die Dermis nicht aus geordneten Zellverbänden, sondern aus einem Netzwerk von unlöslichen Proteinfasern, in das Zellen, Blutgefäße, Nervenbahnen und Schweißdrüsen eingelagert sind. Die Hohlräume des Collagenetzwerks der Dermis sind aber hauptsächlich mit einem stark wasserhaltigen Gel gefüllt, dessen Grundsubstanz die Glykosaminoglykane bzw. Proteoglykane sind [325]. Mit zunehmendem Abstand von der Hautoberfläche und sinkender Spinsondenkonzentration in den Hautschichten nimmt daher die Anzahl der Wassermoleküle zu, die zur Ausbildung einer Hydrathülle pro Spinsondenmolekül zur Verfügung stehen. Durch den zunehmenden Grad der Solvatisierung steigt die Mobilität der Moleküle an. Dieser Effekt wurde auch in den zur Viskositätsbestimmung verwendeten Glycerol-Wasser-Mischungen beobachtet. In diesen sinkt das Wasser-Spinsonden Verhältnis, bei einer Spinsondenkonzentration von 2,5 mM, von ca. 22200:1 auf 440:1 beim Übergang von Wasser zu Glycerol (ca. 98 %) als Lösungsmittel ab. Mit zunehmendem Abstand von der Hautoberfläche nimmt die Ausdehnung der wässrigen Kompartimente in der Haut zu, wodurch die Behinderung der Rotation von solvatisierten Spinsondenmolekülen durch Wechselwirkungen mit Hautstrukturen wahrscheinlich abnimmt.

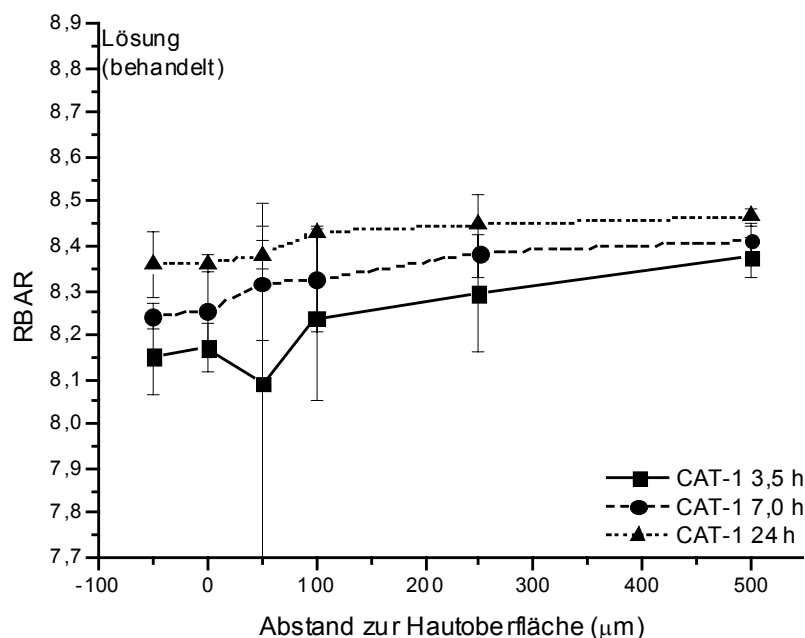


Abb. 112 RBAR-Werte von CAT-1 in Hautproben mit Enzymhemmung in Abhängigkeit vom Abstand zur Hautoberfläche 3,5; 7,0 und 24 Stunden nach epikutaner Applikation von CAT-1 in Lösung ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

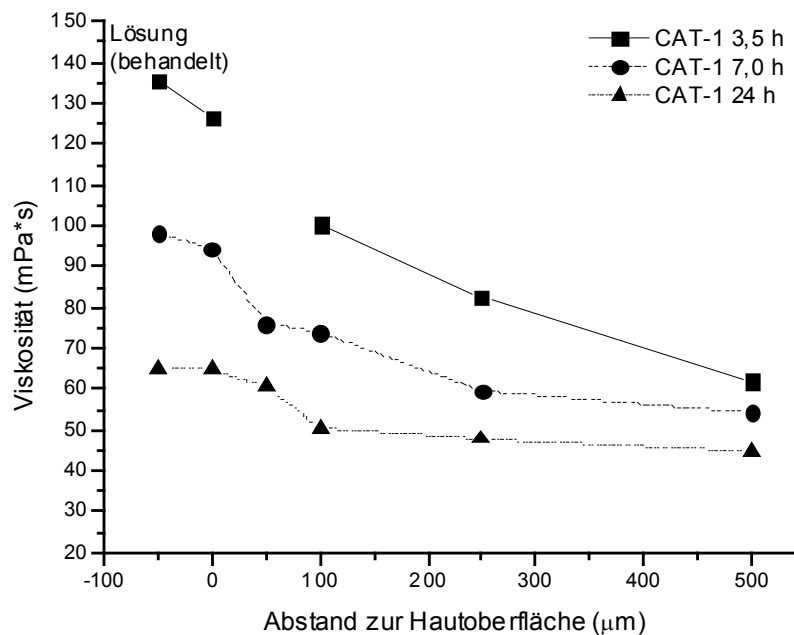


Abb. 113 CAT-1 in Hautproben mit Enzymhemmung in Abhängigkeit vom Abstand zur Hautoberfläche 3,5; 7,0 und 24 Stunden nach epikutaner Applikation von CAT-1 in Lösung

Der Vergleich der RBAR-Werte von CAT-1, das in Liposomen bzw. Lösung epikutan appliziert wurde, zeigt, dass diese 3,5 und 7,0 Stunden nach der Applikation in Lösungen kleiner waren als nach der Applikation in Liposomen. Während die RBAR-Werte von CAT-1 nach der Applikation in Lösungen jedoch kontinuierlich zunahmen, kam es 24 Stunden nach der Applikation in Liposomen zu einem Abfall der RBAR-Werte in den oberen Hautschichten. Dabei sanken die RBAR-Werte unter die entsprechenden Werte des in Lösungen applizierten CAT-1. In tieferen Hautschichten blieben die RBAR-Werte nach der Applikation in Liposomen jedoch größer als nach der Applikation in Lösungen. Tendenziell führten Liposomen daher zu einer Mobilitätszunahme der Spinsonde bzw. zu einer Abnahme der Viskosität ihrer Mikroumgebung in der Haut. Die gegenläufigen zeitlichen Entwicklungen der RBAR-Werte sowie der Viskositäten der Mikroumgebung in der Haut könnten auf die Wechselwirkungen von CAT-1 mit den Bestandteilen der epikutan applizierten Liposomen zurückzuführen sein. Über einen Zusammenhang der vorliegenden Ergebnisse mit dem Depoteffekt der Liposomen können keine Aussagen gemacht werden.

Die RBAR-Werte, die nach der Applikation von CAT-1 in hydrophiler Salbe aus den nach

3,5, 7,0 Stunden und 24 Stunden aufgezeichneten ESR-Tomogrammen bestimmt wurden, liegen in einem Bereich von 8,09 bis 8,66 (Abb. 114). Dabei sind die RBAR-Werte der Spinsonde in den oberen Hautschichten ($-50\ \mu\text{m}$ bzw. $0\ \mu\text{m}$) nur nach 3,5 und 7,0 Stunden kleiner als in den tieferliegenden Hautschichten ($50\ \mu\text{m}$ bis $500\ \mu\text{m}$). Die aus den nach 24 Stunden aufgezeichneten Tomogrammen bestimmten RBAR-Werte zeigen dagegen keine Unterschiede mehr zwischen höheren und tieferen Hautschichten.

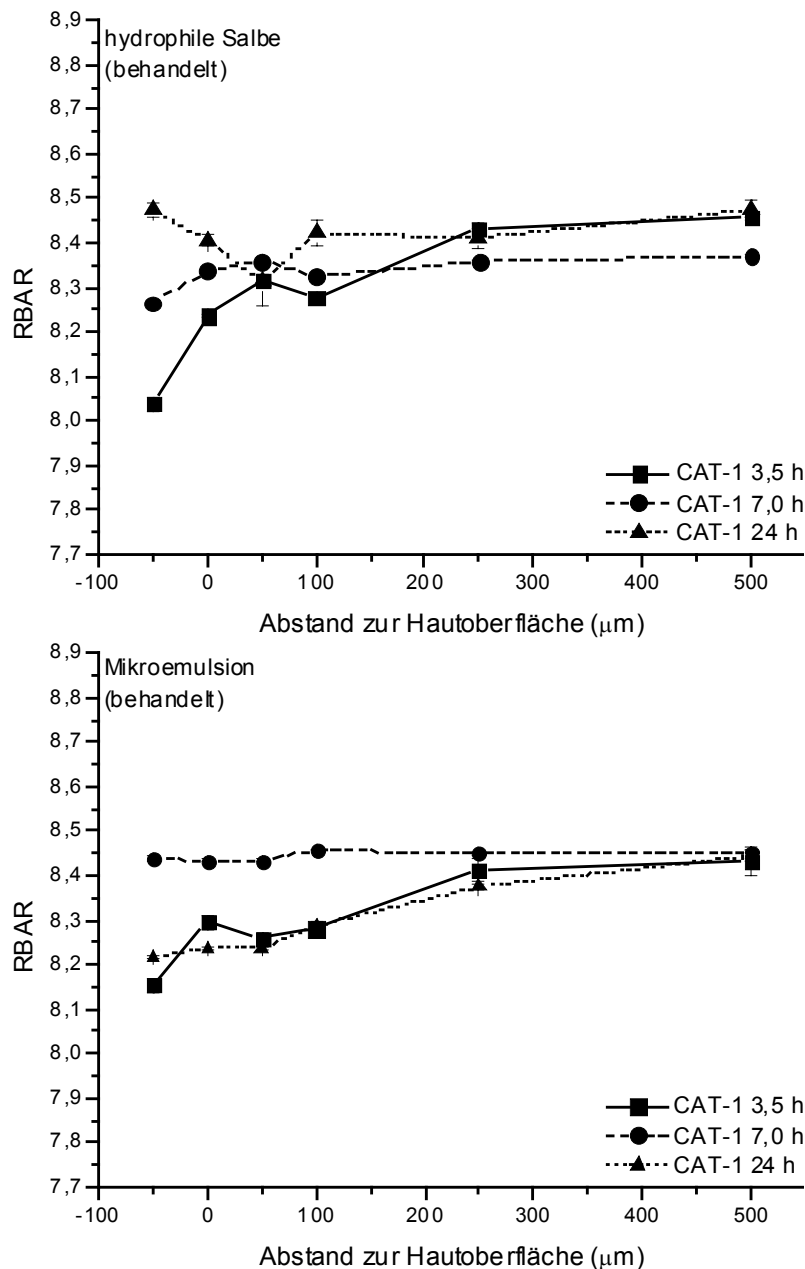


Abb. 114 RBAR-Werte von CAT-1 in Hautproben mit Enzymhemmung in Abhängigkeit vom Abstand zur Hautoberfläche 3,5; 7,0 und 24 Stunden nach epikutaner Applikation von CAT-1 in hydrophiler Salbe bzw. Mikroemulsion

Zeitabhängige Unterschiede zwischen den RBAR-Werten von CAT-1 in den einzelnen Hautschichten konnten nur für die in einem Abstand zur Hautoberfläche von $-50\text{ }\mu\text{m}$ entnommenen ESR-Spektren festgestellt werden. Ebenso wie nach der Applikation in Lösungen nimmt die Mobilität der Spinsonde in diesem Bereich mit steigender Inkubationsdauer zu. Der Vergleich der RBAR-Werte von CAT-1 nach der epikutanen Applikation in hydrophiler Salbe mit denen der anderen Zubereitungen zeigt, dass die Mobilität der Spinsonde nach der Applikation in Liposomen größer ist als nach der Applikation in hydrophiler Salbe bzw. Lösung.

Aus der Bestimmung der RBAR-Werte von CAT-1, das in Mikroemulsion epikutan appliziert wurde, resultieren Werte in einem Bereich von 8,15 bis 8,45 (Abb. 114). Im Gegensatz zu den bisher untersuchten Zubereitungen zeigen die RBAR-Werte von CAT-1 nach der Applikation in Mikroemulsion keine eindeutige Abhängigkeit von der Inkubationsdauer. Während die RBAR-Werte, die aus den nach 3,5 und 24 Stunden aufgezeichneten Tomogrammen bestimmt wurden, nahezu übereinstimmen, sind die RBAR-Werte aus dem nach 7,0 Stunden aufgezeichneten Tomogramm deutlich größer. Letztere zeigen im Gegensatz zu den RBAR-Werten, die aus den nach 3,5 und 24 Stunden aufgezeichneten Tomogrammen bestimmten wurden, keine Zunahme mit steigendem Abstand von der Hautoberfläche. Tendenziell ist die Mobilität von CAT-1, das in Mikroemulsionen epikutan appliziert wurde, kleiner als nach der Applikation in Liposomen.

TEMPOL. An die Spektren von TEMPOL, die aus ESR-Tomogrammen von Hautproben mit und ohne Enzymhemmung entnommen wurden, konnten mit Hilfe des Computerprogramms [49] Spektren mit bekannten Parametersätzen angepasst werden. Aus den Anpassungen an ESR-Spektren, die aus Tomogrammen von Hautproben ohne Enzymhemmung entnommen wurden, resultierten RBAR-Werte mit großen Standardabweichungen. Ebenso wie bei CAT-1 wurde daher auf eine weiterführende Auswertung der Ergebnisse verzichtet.

Aus den ESR-Spektren von TEMPOL, die aus Tomogrammen von Hautproben mit Enzymhemmung entnommen wurden, wurden RBAR-Werte bestimmt, die in einem Bereich von 8,45 bis 8,71 liegen (Abb. 115). Dies entspricht Rotationskorrelationszeiten von $3,53 \cdot 10^{-9}\text{ s}$ bis $1,97 \cdot 10^{-9}\text{ s}$ (Abb. 116). Damit ist die Mobilität von TEMPOL in allen Hautschichten geringer als in wässriger Lösung, in der ein RBAR-Wert von 9,17 bzw. eine Rotationskorrelationszeit von $6,76 \cdot 10^{-10}\text{ s}$ bestimmt wurde. Mit zunehmendem Abstand von der Hautoberfläche

nehmen die RBAR-Werte von TEMPOL zu und die Rotationskorrelationszeiten ab. Das Ergebnis zeigt, dass die Mobilität der Spinsonde in den oberen Schichten der Epidermis im Vergleich zu den tieferliegenden Hautschichten eingeschränkt ist. Der Mobilitätsunterschied wird auch hier auf die Struktur der Haut und die Solvatisierung der Spinsonde zurückgeführt (s.o.).

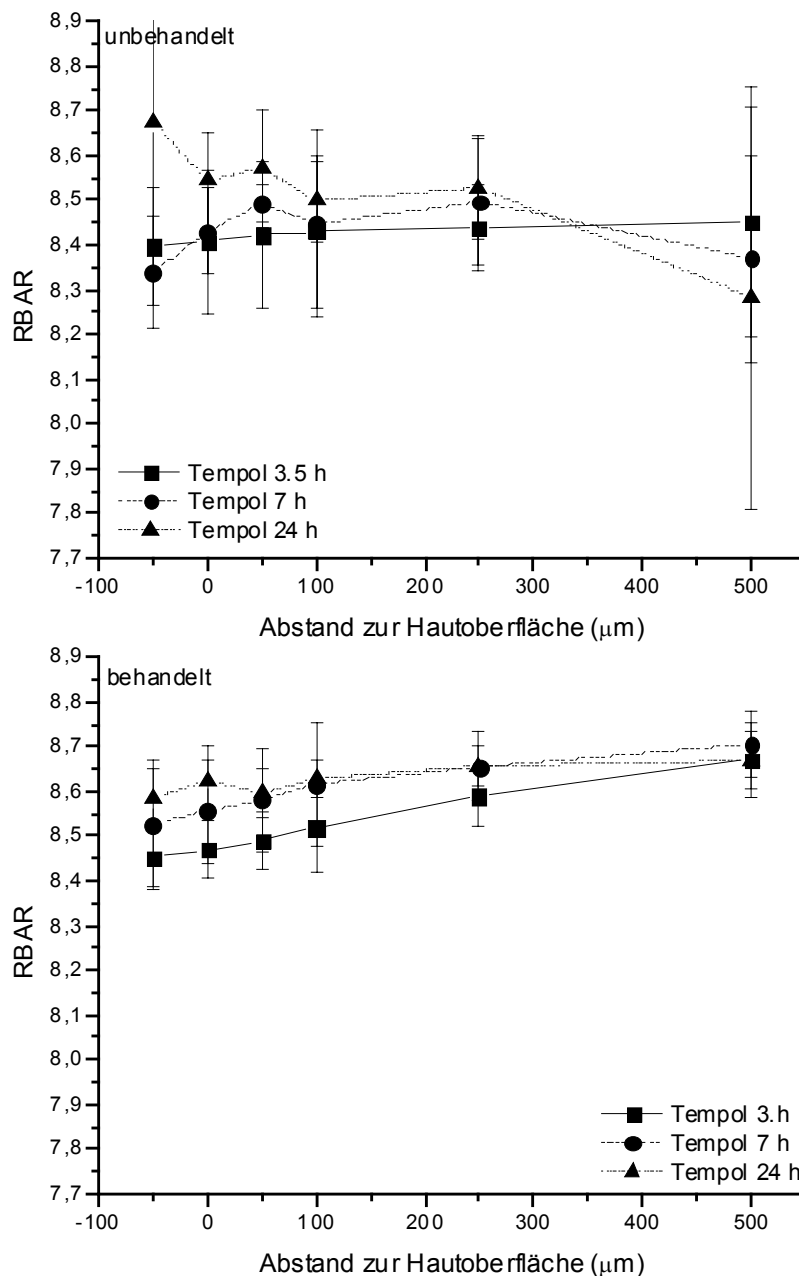


Abb. 115 RBAR-Werte von TEMPOL in unbehandelten (oben) und mit NEM vorbehandelten (unten) Hautproben in Abhängigkeit vom Abstand zur Hautoberfläche 3,5; 7,0 und 24 Stunden nach epikutaner Applikation von TEMPOL in Liposomen (n = 4)

Mit zunehmender Inkubationsdauer stiegen die RBAR-Werte von TEMPOL an. Dadurch wird auch eine Zunahme der Mobilität von TEMPOL in der Haut mit steigender Inkubationsdauer belegt. Während die Mobilität von TEMPOL in einem Zeitraum von 3,5 Stunden bis 7,0 Stunden nach der epikutanen Applikation der Liposomen in allen Hautschichten anstieg, war danach nur noch eine geringe Zunahme in einem Abstand von $-50\ \mu\text{m}$ zur Hautoberfläche bzw. an der Hautoberfläche ($0\ \mu\text{m}$) zu verzeichnen. In einem Abstand von $100\ \mu\text{m}$ bis $500\ \mu\text{m}$ zur Hautoberfläche stimmen die RBAR-Werte, die aus den nach 7,0 Stunden bzw. 24 Stunden aufgezeichneten Tomogrammen bestimmt wurden, nahezu überein.

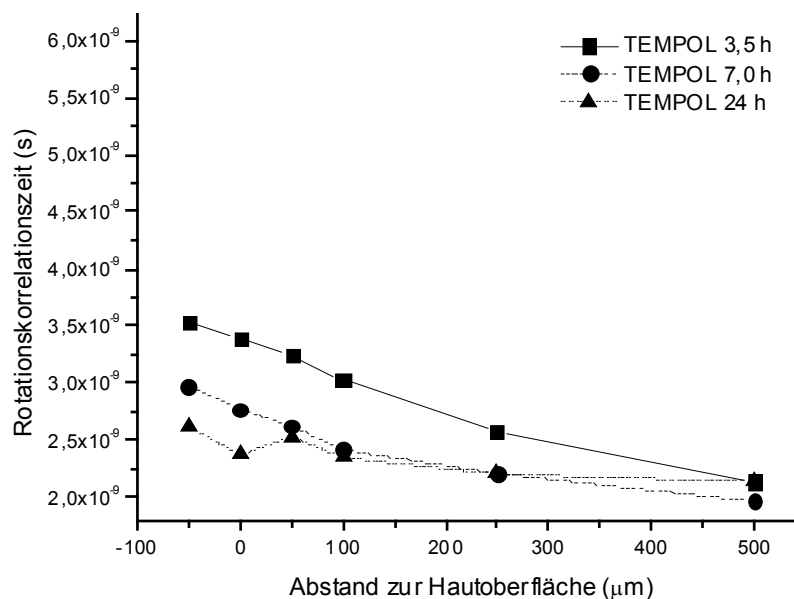


Abb. 116 Rotationskorrelationszeit von TEMPOL in Hautproben mit Enzymhemmung in Abhängigkeit vom Abstand zur Hautoberfläche 3,5; 7,0 und 24 Stunden nach epikutaner Applikation von TEMPOL in Liposomen

Mit Hilfe der an Glycerol-Wasser-Mischungen erstellten Kalibrierfunktion konnte aus den RBAR-Werten die Viskosität der Mikroumgebung von TEMPOL in der Haut berechnet werden (Abb. 117). Nahe der Hautoberfläche wurde 3,5 Stunden nach der epikutanen Applikation der Zubereitung eine maximale Mikroviskosität von $118\ \text{mPa}\cdot\text{s}$ bestimmt. Mit zunehmendem Abstand von der Hautoberfläche sank die Mikroviskosität auf einen Wert von $50\ \text{mPa}\cdot\text{s}$ ab. Im Gegensatz dazu betrug die Mikroviskosität nahe der Hautoberfläche zu den nachfolgenden Zeitpunkten der Untersuchung nur $70 - 88\ \text{mPa}\cdot\text{s}$. Diese nahm ebenfalls bis auf $44 - 50\ \text{mPa}\cdot\text{s}$ ab. Die abnehmenden Rotationskorrelationszeiten und Mikroviskositäts-

werte untermauern die unter 3.5.2 gezogene Schlussfolgerung, dass es mit zunehmender Inkubationsdauer zu einem „Wassereinstrom“ in die oberen Hautschichten kommt. In dessen Folge steigt die Polarität der Mikroumgebung von TEMPOL ebenso an wie die Mobilität der Spinsonde. Gleichzeitig wird durch den „Wassereinstrom“ die Viskosität der Mikroumgebung von TEMPOL verringert.

Im Vergleich zu CAT-1 sind die RBAR-Werte von TEMPOL in der Haut größer und die entsprechenden Rotationskorrelationszeiten kleiner. Dieses Ergebnis ist auf den Radius der modellmäßig angenommenen Kugel zurückzuführen, innerhalb der die Spinsondenmoleküle bei isotroper Bewegung rotieren. Diese Abhängigkeit wird durch Gleichung 8 ausgedrückt.

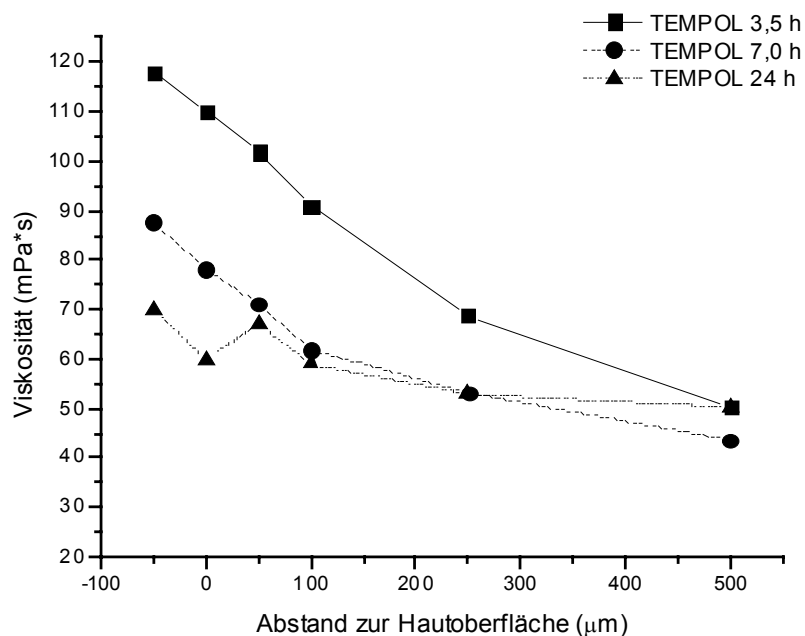


Abb. 116 Viskosität der Mikroumgebung von TEMPOL in Hautproben mit Enzymhemmung in Abhängigkeit vom Abstand zur Hautoberfläche 3,5; 7,0 und 24 Stunden nach epikutaner Applikation von TEMPOL in Liposomen

Im vorliegenden Fall ist anzunehmen, dass der Radius des solvatisierten TEMPOL kleiner ist als der von CAT-1. Im Gegensatz zu CAT-1 nehmen die RBAR-Werte von dem in Liposomen applizierten TEMPOL mit zunehmender Inkubationsdauer zu und die Viskosität der Mikroumgebung ab. Eine übereinstimmende zeitliche Entwicklung der RBAR-Werte und Viskositäten der Mikroumgebung konnte dagegen zwischen dem in Lösung applizierten CAT-1 und dem in Liposomen applizierten TEMPOL festgestellt werden. Das Ergebnis zeigt, dass wahrscheinlich aufgrund der fehlenden positiven Ladung von TEMPOL nur geringe

Wechselwirkungen zwischen der Spinsonde und den Bestandteilen der epikutan applizierten Liposomen auftreten. Zur Überprüfung dieser Feststellung wurden nachfolgend die RBAR-Werte von TEMPOL, das in Lösungen epikutan appliziert wurde, aus ESR-Tomogrammen bestimmt und mit den Ergebnissen der in Liposomen applizierten Spinsonde verglichen.

Die RBAR-Werte, die nach der epikutanen Applikation von TEMPOL in Lösung aus den nach 3,5, 7,0 und 24 Stunden aufgezeichneten ESR-Tomogrammen entnommen wurden, liegen in einem Bereich von 8,42 bis 8,65 (Abb. 118). Dabei waren die RBAR-Werte der Spinsonde in den ersten 7,0 Stunden der Untersuchung in den oberen Hautschichten kleiner als in den tieferliegenden Hautschichten. In einem Zeitraum von 3,5 bis 7,0 Stunden nach der Applikation der Zubereitung war ein gleichmäßiger Anstieg der RBAR-Werte in allen Hautschichten zu verzeichnen. Nach einer Inkubationsdauer von 24 Stunden waren die RBAR-Werte an der Hautoberfläche dagegen größer als in den tieferliegenden Hautschichten. Mit zunehmendem Abstand von der Hautoberfläche nahmen sie bis zum Erreichen einer Tiefe von 100 μm ab und stiegen danach wieder an. Die RBAR-Werte stimmen ab einer Tiefe von 50 μm mit den RBAR-Werten überein, die aus dem nach 7,0 Stunden aufgezeichneten Tomogramm ermittelt wurden.

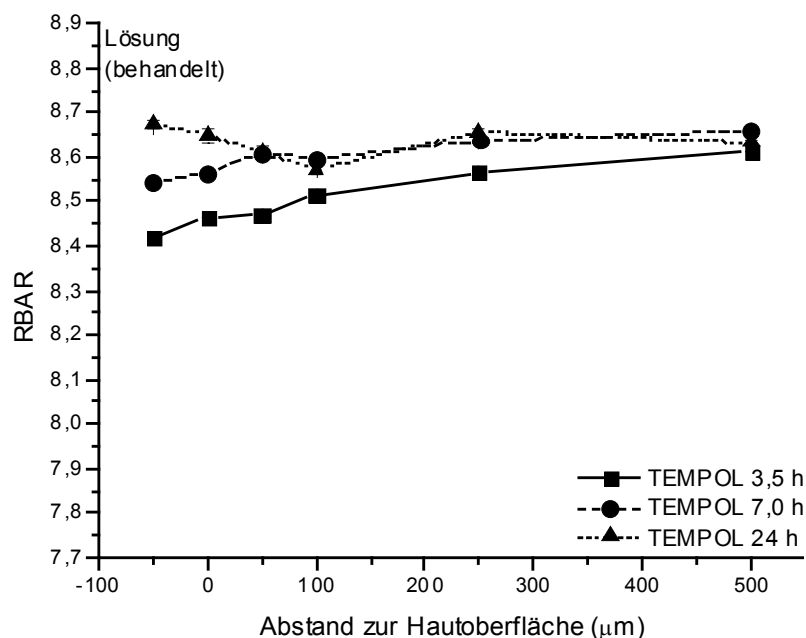


Abb. 118 RBAR-Werte von TEMPOL in Hautproben mit Enzymhemmung in Abhängigkeit vom Abstand zur Hautoberfläche 3,5; 7,0 und 24 Stunden nach epikutaner Applikation von TEMPOL in Lösung

Die Berechnung der Mikroviskositäten ergab 3,5 Stunden nach der epikutanen Applikation der Lösung einen maximalen Wert von 133 mPa·s nahe der Hautoberfläche (Abb. 119). Mit zunehmendem Abstand von dieser sank die Mikroviskosität auf einen Wert von 63 mPa·s ab. Im Gegensatz dazu betrug die Mikroviskosität nahe der Hautoberfläche nach einer Inkubationsdauer von 7,0 Stunden 83 mPa·s und fiel bis auf einen Wert von 52 mPa·s. Nach einer Inkubationsdauer von 24 Stunden stieg die Mikroviskosität mit zunehmendem Abstand von der Hautoberfläche zunächst von 49 mPa·s auf 73 mPa·s an und fiel danach bis auf 58 mPa·s ab.

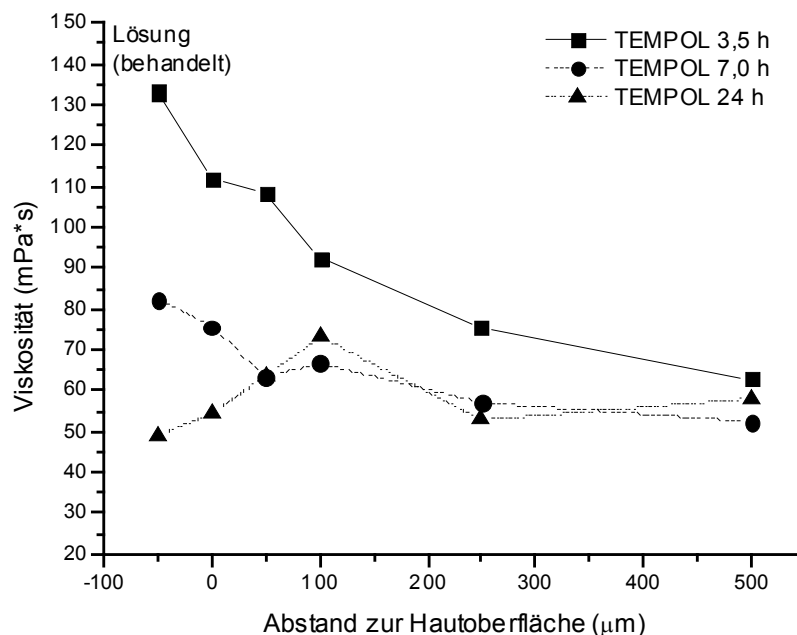


Abb. 119 Viskosität der Mikroumgebung von TEMPOL in Hautproben mit Enzymhemmung in Abhängigkeit vom Abstand zur Hautoberfläche 3,5; 7,0 und 24 Stunden nach epikutaner Applikation von TEMPOL in Lösung

Die mit der Spinsonde TEMPOL erzielten Ergebnisse zeigen nach der epikutanen Applikation in Lösung und Liposomen in Bezug auf die zeitliche Entwicklung der RBAR-Werte und die Mikroviskositäten in der Haut eine gute Übereinstimmung. Dadurch wird die Vermutung bestätigt, dass die Mobilität der Spinsonde in der Haut, im Gegensatz zu der von CAT-1, durch Bestandteile von Liposomen nicht verändert wird. Für eine Veränderung der Mobilität von CAT-1 in der Haut durch epikutan applizierte Liposomen spricht dagegen die Abweichung der Mikroviskositäten von den Viskositätswerten, die nach der Applikation von CAT-1 in Lösung und TEMPOL in Lösung bzw. Liposomen bestimmt wurden.

Die RBAR-Werte, die nach der Applikation von TEMPOL in hydrophiler Salbe aus den nach 3,5, 7,0 und 24 Stunden aufgezeichneten Tomogrammen bestimmt wurden, liegen in einem Bereich von 8,41 bis 8,70 (Abb. 120). Die Werte in den oberen Hautschichten sind kleiner als in den tieferliegenden Hautschichten. Während die RBAR-Werte der Spinsonde in einem Zeitraum von 3,5 Stunden bis 7,0 Stunden nach der Applikation in hydrophiler Salbe abnehmen, erfolgte bis zum Ende der Untersuchung eine Zunahme auf Werte, die zwischen denen der früheren Zeitpunkte liegen.

Eine eindeutige Tendenz in der Entwicklung der RBAR-Werte in Abhängigkeit von der Zeit konnte damit nicht festgestellt werden. Dies könnte ein Hinweis auf die Wechselwirkungen zwischen der Spinsonde und Bestandteilen der hydrophilen Salbe in der Haut sein. Darauf deutet auch die Abnahme der Aufspaltung von TEMPOL in der Haut hin, die nach der epikutanen Applikation in hydrophiler Salbe im Vergleich zur Applikation in Lösung auftritt.

Nach der epikutanen Applikation von TEMPOL in Mikroemulsion wurden aus den nach 3,5, 7,0 und 24 Stunden aufgezeichneten Tomogrammen RBAR-Werte bestimmt, die in einem Bereich von 8,61 bis 8,78 liegen. Im Gegensatz zu den anderen untersuchten Zubereitungen konnte nach der Applikation in Mikroemulsion weder eine zeitabhängige Veränderung noch eine Zunahme der RBAR-Werte mit zunehmendem Abstand von der Hautoberfläche festgestellt werden. Die RBAR-Werte von TEMPOL waren nach der Applikation in Mikroemulsion im Vergleich zu allen anderen Zubereitungen deutlich erhöht. Da diese Erhöhung nach der Applikation von CAT-1 in Mikroemulsion nicht festgestellt wurde, kann sie eventuell auf eine mit der sehr geringen Signalintensität verbundene fehlerhafte Spektrenanpassung zurückgeführt werden.

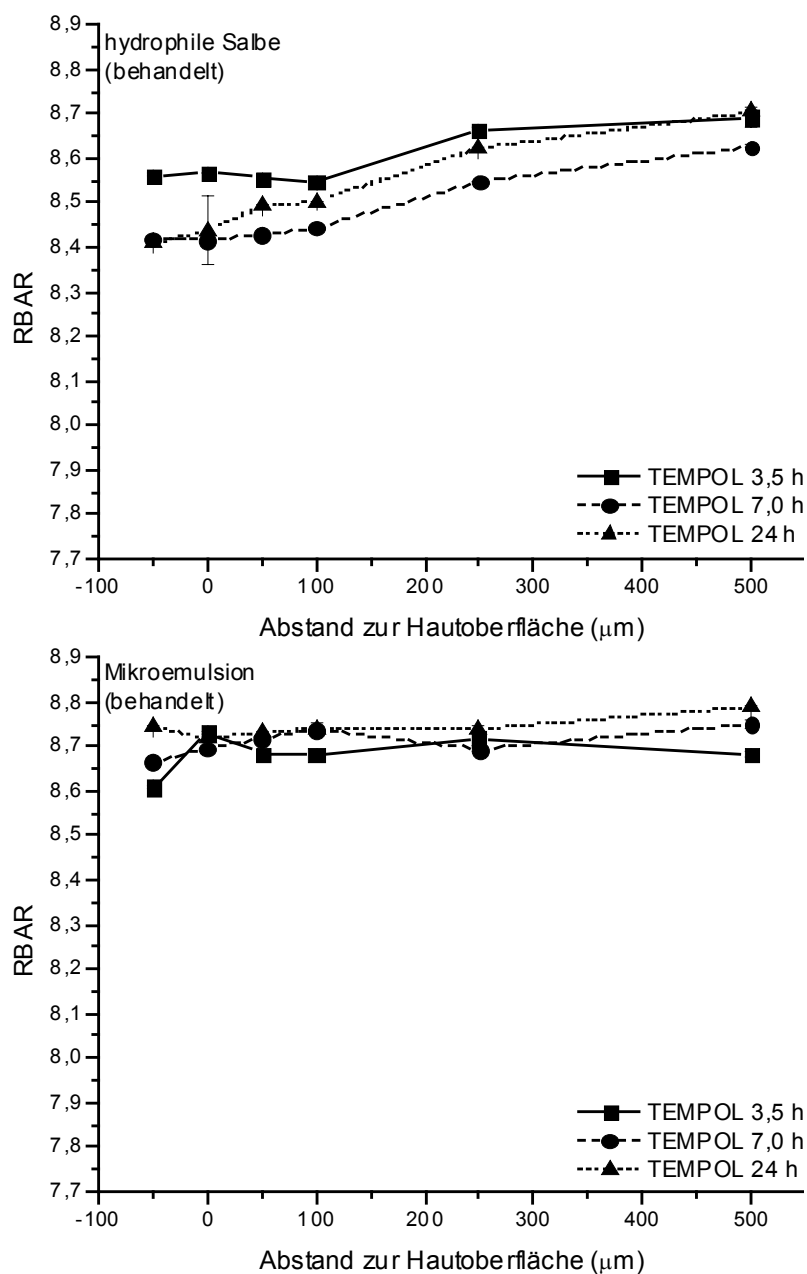


Abb. 120 RBAR-Werte von TEMPOL in Hautproben mit Enzymhemmung in Abhängigkeit vom Abstand zur Hautoberfläche 3,5; 7,0 und 24 Stunden nach epikutaner Applikation von TEMPOL in hydrophiler Salbe bzw. Mikroemulsion

3.5.4 Diskussion

Zur Charakterisierung der Penetration von liposomal eingeschlossenen ESR-Spinsonden in die Haut mit Hilfe der ESR-Tomografie wurden Untersuchungen mit unilamellaren

Liposomen aus partialsynthetischen Grundlagen bzw. Sojabohnenlipiden durchgeführt. Diese wurden mit Nitroxidspinsonden mit unterschiedlichen physikalisch-chemischen Eigenschaften, insbesondere variierender Lipophilie (CAT-1, TEMPOL, TEMPOL-benzoat) beladen. Durch den Vergleich mit konventionellen topischen Zubereitungen wurden die Depotwirkung und Penetrationsförderung von Liposomen in Abhängigkeit von der Auswahl der Liposomengrundlagen, der Fluidität der Liposomenmembranen und der Hydro-/ Lipophilie der eingesetzten Spinsonden charakterisiert. Um zwischen verkapselten und freigesetzten Anteilen der Spinsonden differenzieren zu können, wurde in einem Teil der Hautproben die Reduktion der Spinsonden durch die Blockade reduzierender Komponenten mit N-Ethylmaleinimide gehemmt. Anhand der durchgeführten Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Penetration von ESR-Spinsonden in die Haut zeitabhängig mit Hilfe der ESR-Tomografie verfolgt werden kann. Dabei ist zu berücksichtigen, dass die Amplituden der registrierten ESR-Signale aufgrund von Dipol-Dipol- und Spinaustausch-Wechselwirkungen nicht linear mit der Konzentration der Spinsonde ansteigen. Um auf die reale Verteilung der Spinsonde in der Haut schließen zu können, ist es daher notwendig, die integrale Intensität zu berechnen (z.B. näherungsweise aus den Linienbreiten und Amplituden der ESR-Signale). Mit Hilfe der ESR-Tomografie konnte belegt werden, dass die Verteilung der Spinsonde in den untersuchten Hautproben von der Struktur der Spinsonde und der Polarität der verschiedenen Hautbereiche abhängt. Dementsprechend konnte für die positiv geladene Spinsonde CAT-1 eine Anreicherung in der oberen Dermis nachgewiesen werden, für die eine erhöhte Polarität im Vergleich zur Epidermis ermittelt wurde. Im Gegensatz zu CAT-1 liegen nach der epikutanen Applikation der amphiphilen Spinsonde TEMPOL im Vergleich zu der oberen Dermis geringfügig erhöhte Konzentrationen der Spinsonde in der Epidermis vor. Sowohl bei der Verwendung von CAT-1 als auch bei der Verwendung von TEMPOL konnte gezeigt werden, dass nach einer Inkubationszeit von mehr als 24 Stunden Unterschiede zwischen den einzelnen epikutan applizierten Liposomenformulierungen messbar sind. Liposomen mit rigiden Membranen führen im Vergleich zu Liposomen mit fluiden Membranen zu höheren Spinsondenkonzentrationen in der Haut und solche aus partialsynthetischen Lipiden zu höheren Konzentrationen als Liposomen aus Sojabohnenlipiden.

Der Vergleich der Penetration von CAT-1 und TEMPOL in die Haut nach epikutaner

Applikation von Liposomen mit der Penetration der Spinsonden aus anderen topischen Zubereitungen zeigt, dass eine generelle Aussage zur Penetrationsförderung durch die Anwendung von Liposomen problematisch ist. Durch die zeitabhängige Auswertung der ESR-Signale von CAT-1 in der Haut konnte nachgewiesen werden, dass die Anreicherung der Spinsonde im Bereich der oberen Dermis über 24 Stunden erhalten bleibt. Da die vesikuläre Struktur auf der Hautoberfläche nach epikutaner Applikation der Liposomen verloren geht, kann davon ausgegangen werden, dass dieser Depoteffekt nicht an das Vorhandensein von Liposomen gebunden ist. Durch den Vergleich der zeitabhängigen Entwicklung der Signalintensitäten von CAT-1 nach epikutaner Applikation von dialysierten und undialysierten Liposomen konnte belegt werden, dass zunächst der nicht verkapselte Anteil von CAT-1 in die Haut penetriert, bevor die Spinsonde, die von dem auf der Hautoberfläche entstehenden Lipidfilm eingeschlossen wird, in die Haut eindringt. Im Gegensatz zu CAT-1 führt die epikutane Applikation von TEMPOL auf Hautproben auch ohne Hemmung der reduzierenden Faktoren zu intensiven ESR-Signalen. Dadurch wird belegt, dass die Penetrationsgeschwindigkeit von TEMPOL höher ist als die Reduktionsgeschwindigkeit in der Haut. Aufgrund der amphiphilen Eigenschaften dieser Spinsonde erfolgt außerdem ihre im Vergleich zu CAT-1 schnellere Penetration in tiefere Hautschichten.

Die Auswirkung von epikutan applizierten Liposomen und anderen topischen Zubereitungen (Lösung, hydrophile Salbe, Mikroemulsion) auf die Polarität der Haut wurde anhand der polaritätsabhängigen Hyperfeinaufspaltung der Spinsonden CAT-1 und TEMPOL ortsabhängig untersucht. Für die Spinsonden wurden mit zunehmendem Abstand von der Hautoberfläche ansteigende Hyperfeinaufspaltungen der ESR-Signale ermittelt, wobei die Polarität im Bereich der Epidermis geringer als in der Dermis ist (s.o.). Der Vergleich der Hyperfeinaufspaltungsprofile von CAT-1 und TEMPOL zeigt, dass eine Veränderung der Polarität der Haut durch epikutan applizierte Liposomen bzw. Mikroemulsion ausgeschlossen werden kann. Dagegen konnten nach der epikutanen Applikation von hydrophiler Salbe geringfügig verminderte Hyperfeinaufspaltungen von TEMPOL nachgewiesen werden, die auf eine Verminderung der Polarität in der Haut durch Bestandteile der hydrophilen Salbe hinweisen. Mit zunehmender Inkubationsdauer konnte allerdings eine ansteigende Hyperfeinaufspaltung des TEMPOL-Signals festgestellt werden, die eine Zunahme der Polarität der

Spinsondenumgebung in der Epidermis und Dermis belegt. Eine Ursache dafür könnte ein osmotisch bedingter Einstrom von Wasser in diese Hautschichten sein. Durch einen Vergleich der Hyperfeinaufspaltungen von TEMPOL in Hautproben mit und ohne Enzymhemmung konnte weiterhin nachgewiesen werden, dass die Vorbehandlung der Haut mit N-Ethylmaleinimid zu einem Anstieg der Polarität der Mikroumgebung der Spinsonde führt.

Durch die ortsabhängige Auswertung der Spinsondenmobilität sollten nähere Informationen über Wechselwirkungen zwischen Bestandteilen von epikutan applizierten Liposomen bzw. anderen topischen Zubereitungen und Spinsonden in der Haut erhalten werden. Die Bandbreite der ortsabhängig berechneten Rotationskorrelationszeiten von CAT-1 und TEMPOL in der Haut reicht nach der epikutanen Applikation der Spinsonden in Liposomen von $5,94 \cdot 10^{-9}$ s bis $1,97 \cdot 10^{-9}$ s. Dies entspricht einer Viskosität der Mikroumgebung von CAT-1 bzw. TEMPOL von 118 bis 26 mPa·s. Damit sind die Spinsondenmobilitäten in allen Hautschichten geringer als in wässriger Lösung. Im Vergleich zu CAT-1 sind die Rotationskorrelationszeiten von TEMPOL in der Haut kürzer, was auf die Molekülgeometrie der Spinsonde zurückzuführen ist. Mit zunehmendem Abstand von der Hautoberfläche nimmt die Mobilität der Spinsonden in der Haut zu. Durch einen Vergleich der Rotationskorrelationszeiten nach epikutaner Applikation der Spinsonden in Liposomen bzw. Lösung wurde deutlich, dass diese Mobilitätsunterschiede auf die Strukturen der Haut, insbesondere den mit steigendem Abstand von der Oberfläche zunehmenden Wassergehalt und den Solvatisierungsgrad der Spinsonde zurückzuführen sind. Im Gegensatz zur Applikation von CAT-1 in Liposomen steigt die Mobilität der Spinsonde nach epikutaner Applikation einer Lösung mit zunehmender Versuchsdauer an. Diese entgegengesetzten zeitlichen Entwicklungen sind ein Hinweis auf Wechselwirkungen zwischen Bestandteilen von Liposomen und der positiv geladenen Spinsonde in der Haut. Tendenziell ist die Mobilität der Spinsonde nach Applikation in Liposomenform gegenüber der Mobilität nach Applikation als Lösung, hydrophiler Salbe oder Mikroemulsion jedoch erhöht. Die Rotationskorrelationszeiten bzw. Viskositäten der Mikroumgebung von TEMPOL, die nach der Applikation der Spinsonde in Liposomen bzw. Lösung zeit- und ortsabhängig bestimmt wurden, stimmen nahezu überein. Daraus kann geschlossen werden, dass die Mobilität der ungeladenen Spinsonde in der Haut durch Bestandteile der epikutan applizierten Liposomen nicht verändert wird. Im Unterschied

dazu zeigt die Mobilität der Spinsonde CAT-1 in verschiedenen Hautschichten eine Abhängigkeit von den Bestandteilen der epikutan applizierten Liposomen. Während nach der epikutanen Applikation von TEMPOL in hydrophiler Salbe eine zeitabhängige Veränderung der Spinsondenmobilität festgestellt werden konnte, blieb diese nach der Applikation der Spinsonde in Mikroemulsion mit fortschreitender Versuchsdauer nahezu konstant.

4 Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen konnte das Prinzip der spektral-räumlich aufgelösten Elektronenspinresonanz (ESR) zur Bearbeitung biopharmazeutischer Fragestellungen speziell bei epikutan applizierten Arzneiträgersystemen adaptiert und weiterentwickelt werden. Neben der methodischen Weiterentwicklung stand die Betrachtung der Mobilität von epikutan applizierten ESR-Spinsonden im Mittelpunkt, wobei bisher ungeklärte Fragen zu den Wechselwirkungen zwischen Liposomen und Haut besonders berücksichtigt wurden.

Dazu wurden zunächst Liposomen für den Einsatz in Transportstudien mit dem Verfahren der Membranextrusion hergestellt, und ihre Eigenschaften in Abhängigkeit von der Zusammensetzung der Lipidmembranen charakterisiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass ein zunehmender Anteil von Phosphatidylglycerol in der Membran nicht nur zu einer Absenkung des Zetapotenzials, sondern z. T. auch zu einer Verminderung des Durchmessers der extrudierten Liposomen führt. Steigende Cholesterolanteile ziehen dagegen eine Zunahme der Liposomendurchmesser nach sich und führen darüber hinaus zu Änderungen der Viskosität der Lipiddoppelmembranen. Während Cholesterol auf die Membran von Liposomen aus nicht hydrierten Phospholipiden einen kondensierenden Effekt ausübt, durch den die Membranviskosität zunimmt, haben steigende Cholesterolanteile in Liposomen aus hydrierten Phospholipiden eine Abnahme der Membranviskosität zur Folge. Die Größe der Liposomen ist nicht nur über die Zusammensetzung ihrer Lipidmembranen, sondern vor allem über die Porengröße der zur Extrusion verwendeten Membranfilter steuerbar. Einen nur geringen Einfluss auf die Durchmesser der extrudierten Liposomen hat dagegen der Anteil der Lipidgrundlage in der Formulierung. Der Liposomendurchmesser steigt erst mit einer stark eingeschränkten Extrusionsfähigkeit der Formulierungen an.

Für die Untersuchungen mit Hilfe der ESR-Spektroskopie und Tomografie wurden die Nitroxylradikale CAT-1, TEMPO, ¹⁵N-TEMPO, TEMPOL, TEMPOL-benzoat und 5-Doxylpalmitinsäure ausgewählt. Die Beladungsfähigkeit der Liposomen mit ESR-Spinsonden ist stark abhängig von deren Hydro-/ Lipophilie und für die lipophile Spinsonde TEMPOL-benzoat stark eingeschränkt. Die Beladung der Liposomen mit Spinsonden hat Änderungen

ihrer Durchmesser und Zetapotenziale zur Folge, deren Richtung von der ausgewählten Liposomengrundlage und der ESR-Spinsonde abhängig ist. Die Kurzzeitstabilität von Liposomen wird durch die Beladung nicht verändert. Als limitierender Faktor für die Lagerung der beladenen Liposomen ist dagegen die Stabilität der ESR-Spinsonden in den Formulierungen anzusehen.

Zur weiteren Charakterisierung der Liposomen, deren Einsatz in Transportstudien geplant war, wurden die Verkapselungseffizienz von CAT-1 und die Freisetzung der Spinsonde in Abhängigkeit von der Lamellarität und den Membraneigenschaften der Vesikel bestimmt. Die Verkapselungseffizienz der Spinsonde ist in multilamellaren Liposomen erwartungsgemäß höher als in unilamellaren Liposomen und wird durch den Gehalt an Cholesterol in den Lipidmembranen nicht beeinflusst. Dagegen konnte eine mit steigendem Cholesterolanteil verminderte Freisetzungsgeschwindigkeit der Spinsonde aus Liposomen mit nicht hydrierten Phospholipiden nachgewiesen werden. Die Freisetzung von CAT-1 ist aus Liposomen, deren Membranen aus nicht hydrierten Phospholipiden bestanden, gegenüber solchen, deren Membranen aus hydrierten Phospholipiden bestanden, generell erhöht.

Die Untersuchungen zur Integrität von epikutan applizierten uni- und multilamellaren Liposomen ergaben, dass unilamellare Liposomen ihre Integrität schneller verlieren als multilamellare Liposomen und solche aus nicht hydrierten Phospholipiden schneller als Liposomen aus hydrierten Phospholipiden. Mit einem neu entwickelten Versuchsansatz, bei dem die Freisetzung von CAT-1 direkt anhand von spektralen Veränderungen registriert werden kann, wurde untersucht, wie lange intakte Liposomen unter nicht okklusiven bzw. okklusiven Bedingungen auf der Haut *in vitro* und *in vivo* als Wirkstoffdepot zur Verfügung stehen. Der Vorteil dieses Versuchsansatzes, bei dem liposomal verkapselte Anteile der Spinsonde ein Singulett Signal und freigesetzte Anteile ein Triplett Signal aufweisen, gegenüber der bisher in der Literatur beschriebenen Methode zur Untersuchung der Freisetzung von hydrophilen ESR-Spinsonden aus Liposomen besteht darin, dass auf den Zusatz von Natriumascorbat als die Freisetzungsgeschwindigkeit stark erhöhendes Reduktionsmittel verzichtet werden kann. Dadurch wurde es möglich, die Stabilität für einen Teil der epikutan applizierten multilamellaren Liposomen aus den Lipidgrundlagen Presomen® C1 und

Presomen® PPG-I über 300 Minuten *in vitro* nachzuweisen. Gleichzeitig konnte über eine Veränderung der spektralen Eigenschaften der freigesetzten und der verkapselten Anteile belegt werden, dass der zunehmende Wasserverlust aus der Formulierung zu einer Erhöhung der Spinsondenkonzentration sowohl in der äußeren als auch in der inneren Phase der Liposomen führt. Im Vergleich zu ebenfalls epikutan applizierten Lösungen konnte gezeigt werden, dass Liposomen den Wasserverlust aus der Zubereitung stark verzögern und dadurch eine Kristallisation der Spinsonde aus der Zubereitung verhindern. Letztere konnte durch *In-vivo*-Untersuchungen in epikutan auf Nacktmäuse applizierten Liposomenzubereitungen nachgewiesen werden, aus denen der Wasserverlust aufgrund der Körpertemperatur der Tiere beschleunigt ist. Unter okklusiven Bedingungen erweisen sich die untersuchten multilamellaren Liposomen über 300 Minuten sowohl *in vitro* als auch *in vivo* als stabil. Diese erhöhte Stabilität und die dadurch verminderte Kontaktfläche zwischen den Liposomen und der Haut könnte der Grund für die verminderte Penetration von okklusiv applizierten, liposomal eingeschlossenen Arzneistoffen sein, über die einige Autoren berichten. Dagegen konnte für CAT-1, das in Lösungen epikutan appliziert wurde, *in vitro* eine Penetration in die Haut nachgewiesen werden, und damit die in der Literatur beschriebene verstärkte Hautpenetration von Arzneistoffen unter okklusiven Bedingungen bestätigt werden. Unter *In-vivo*-Bedingungen war dies wahrscheinlich aufgrund des Abtransports von CAT-1 über das Blut und Lymphsystem in der Haut und die dadurch verminderten Signalintensitäten nicht möglich.

In weiteren Untersuchungen wurde die Integrität von Liposomen nach subkutaner Injektion nicht invasiv mit Hilfe der L-Band-ESR *in vivo* untersucht. Nach der subkutanen Injektion von Liposomen, die zur Ausbildung von Depots hochpotenter Arzneistoffe ausgenutzt wird, konnten intakte Liposomen bis zum Ende der Untersuchung nach 96 Stunden am Injektionsort nachgewiesen werden. Da zu diesem Zeitpunkt noch ca. 60 % der injizierten Spinsonden am Injektionsort nachweisbar sind, ist mit ihrer erheblich langsameren Freisetzung zu rechnen. Die Reduktion von freigesetzten Anteilen der Spinsonde innerhalb der ersten Stunden nach der Injektion belegt die Bedeutung der Vesikelstruktur für den Depoteffekt von Liposomen. Anhand der spektralen Informationen konnte zwischen 24 und 96 Stunden eine kontinuierliche Freisetzung der Spinsonde belegt werden. Im Unterschied zu den injizierten Liposomen führt die subkutane Applikation von CAT-1 in Lösungen nicht zu einer Fixierung

der Spinsonde in einem lokalen Depot, sondern zu einer raschen Absorption, systemischen Verteilung und Reduktion der Spinsonde.

Nachdem die Integrität von Liposomen nach epikutaner und subkutaner Applikation analysiert wurde, sollten durch weiterführende Untersuchungen anhand der Mobilität von CAT-1 Erkenntnisse über die Fixierung von hydrophilen Substanzen durch Liposomenbestandteile auf der Haut gewonnen werden. Die Ergebnisse der Untersuchungen belegen, dass die Mobilität der Spinsonde nach epikutaner Applikation stark abnimmt, und der überwiegende Anteil der Spinsonde auf dem Stratum corneum kristallisiert. Es konnte gezeigt werden, dass die Mobilität der Spinsonde nach der Applikation in Liposomen aus hydrierten Phospholipiden langsamer abnimmt als nach der Applikation in Liposomen aus nicht hydrierten Phospholipiden. Dagegen führt ein Cholesterolanteil von 50 % im Vergleich zu Zubereitungen mit einem reduzierten Cholesterolanteil zu einer raschen Fixierung der Spinsonde auf dem Stratum corneum. Die Berechnung der Viskosität der Mikroumgebung von CAT-1 auf der Haut zeigt, dass diese innerhalb von 3,5 Stunden nach Applikation der Spinsonde auf die Haut von ca. 3 mPa·s auf maximal 1075 mPa·s zunahm.

Veränderungen der liposomalen Lipiddoppelmembranen, die nach epikutaner Applikation auftreten, wurden anhand der Mobilität der Spinsonde 5-Doxylpalmitinsäure bzw. ihrer Ordnungsparameter untersucht. Die Ergebnisse belegen, dass der kondensierende Effekt von Cholesterol auf die Lipiddoppelmembran von Liposomen aus nicht hydrierten Phospholipiden sowohl vor als auch nach deren epikutaner Applikation anhand der Zunahme der Ordnungsparameter der Spinsonde nachgewiesen werden kann. Mit der Applikation der Liposomen nimmt deren Membranflexibilität ab. Die Bestimmung der isotropen Hyperfeinaufspaltung der Spinsonde zeigt zudem, dass die Polarität der Mikroumgebung der Spinsonde mit steigendem Cholesterolgehalt zunimmt und nach der Applikation der Liposomen weiter ansteigt. Im Gegensatz zu Liposomen aus nicht hydrierten Phospholipiden zieht ein zunehmender Anteil an Cholesterol in Liposomen aus hydrierten Phospholipiden eine Flexibilisierung der Lipiddoppelmembranen nach sich. Diese konnte nach der Applikation der Liposomen nicht mehr nachgewiesen werden. Spinaustauschwechselwirkungen belegen vielmehr eine teilweise Entmischung der Lipidmembranen während der Auftrocknung der Liposomen. Die Ergebnisse der Untersuchung zeigen, dass es entgegen bisheriger Annahmen nach der

Applikation nicht nur zu einer Veränderung des Dispersitätsgrads, sondern auch zu einer Änderung der Membraneigenschaften der Liposomen kommt.

Um Informationen über Mobilitätsänderungen der Stratum-corneum-Lipide durch epikutan applizierte Liposomen und den Penetrationsenhancer Ölsäure zu erhalten, wurden die Ordnungsparameter der Spinsonde 5-Doxylpalmitinsäure nach deren Inkorporation in das Stratum corneum analysiert. Diese weisen die intercorneozytären Lipiddoppelschichten des Stratum corneum als geordnetes System von geringer Flexibilität aus. Es konnte gezeigt werden, dass durch die Inkubation der Hautproben mit Phosphatpuffer die Mobilität der Spinsonde im Stratum corneum erhöht wird. Die Inkubation mit den unterschiedlichen Liposomenformulierungen führt dagegen zu keiner weiteren Mobilitätszunahme. Eine als „dramatisch“ bezeichnete Fluidisierung der Lipiddoppelschichten durch Bestandteile von Liposomen aus nicht hydrierten Phospholipiden bzw. die Abnahme der Flexibilität der Lipiddoppelschichten durch Liposomen aus hydrierten Phospholipiden konnte im Gegensatz zu den von Ogiso et al. [302, 304] mit Liposomen aus Stratum-corneum-Lipiden erhaltenen Ergebnissen nicht festgestellt werden. Dagegen zieht die Applikation von Ölsäure eine starke, lang anhaltende Fluidisierung der Lipiddoppelschichten des Stratum corneum nach sich, verbunden mit einer Verringerung der Ordnungsparameter.

Vor der Durchführung von Transportstudien mit der ESR-Tomografie sollte zunächst geklärt werden, ob diese die Erfassung von räumlich-spektralen Informationen in definierten Hautschichten erlaubt. Die Überprüfung der Möglichkeit einer nicht invasiven Erfassung und Abbildung der verschiedenen Schichten der Humanhaut erfolgte anhand der polaritätsabhängigen Hyperfeinaufspaltung der amphiphilen Spinsonde ^{15}N -TEMPO. Aufgrund der ortsabhängig ermittelten Hyperfeinaufspaltungen konnten die drei Hautbereiche Epidermis, obere Dermis und untere Dermis bzw. der Übergangsbereich zur Subcutis anhand ihrer unterschiedlichen Anteile an hydrophilen und lipophilen Strukturen differenziert werden. Die ermittelten Abmessungen der Hautabschnitte liegen im Bereich der in der Literatur zu findenden Werte.

Weiterhin wurde untersucht, ob durch die Adaptation des von Freed für die cw-Spektroskopie

entwickelten Computerprogramms spektrale Parameter von Spinsonden, insbesondere deren Rotationskorrelationszeiten, aus ESR-Tomogrammen bestimmt werden können. Ergebnisse derartiger Untersuchungen liegen bisher in der Literatur nicht vor. Die anhand von Glycerol-Wasser-Mischungen durchgeführten Untersuchungen ergaben, dass die Rotationskorrelationszeiten von ESR-Spinsonden aus ESR-Tomogrammen mit Hilfe dieses Programms mit akzeptabler Genauigkeit berechnet werden können. Im Gegensatz zu der von Fraenkel und Freed angegebenen und vielfach genutzten empirischen Beziehung zur Berechnung von Rotationskorrelationszeiten konnte gezeigt werden, dass das Computerprogramm auch auf Spektren mit einem ungünstigen Signal-Rausch-Verhältnis anwendbar ist und die erzielten Ergebnisse unabhängig von der eingestrahlten Mikrowellenfrequenz sind (L-, S- bzw. X-Band-ESR). Darüber hinaus können durch die Anwendung des Computerprogramms die Rotationskorrelationszeiten von zwei nebeneinander vorliegenden Spinsondenspezies bestimmt und die Anteile der Spezies am Gesamtspektrum orts aufgelöst quantifiziert werden. Die Rotationskorrelationszeiten von Spinsonden sind erwartungsgemäß sowohl von der Molekülgeometrie als auch von der Viskosität der Mikroumgebung abhängig.

Zur Charakterisierung der Penetration von liposomal eingeschlossenen ESR-Spinsonden in die Haut mit Hilfe der ESR-Tomografie wurden Untersuchungen mit unilamellaren Liposomen aus partialsynthetischen Grundlagen bzw. Sojabohnenlipiden durchgeführt. Diese wurden mit Nitroxidspinsonden mit unterschiedlichen physikalisch-chemischen Eigenschaften, insbesondere variierender Lipophilie (CAT-1, TEMPOL, TEMPOL-benzoat) beladen. Durch den Vergleich mit konventionellen topischen Zubereitungen wurden die Depotwirkung und Penetrationsförderung von Liposomen in Abhängigkeit von der Auswahl der Liposomengrundlagen, der Fluidität der Liposomenmembranen und der Hydro-/ Lipophilie der eingesetzten Spinsonden charakterisiert. Um zwischen verkapselten und freigesetzten Anteilen der Spinsonden differenzieren zu können, wurde in einem Teil der Hautproben die Reduktion der Spinsonden durch die Blockade reduzierender Komponenten mit N-Ethylmaleinimide gehemmt. Anhand der durchgeführten Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Penetration von ESR-Spinsonden in die Haut zeitabhängig mit Hilfe der ESR-Tomografie verfolgt werden kann. Dabei ist zu berücksichtigen, dass die Amplituden der registrierten ESR-Signale aufgrund von Dipol-Dipol- und Spinaustausch-Wechselwirkungen nicht linear

mit der Konzentration der Spinsonde ansteigen. Um auf die reale Verteilung der Spinsonde in der Haut schließen zu können, ist es daher notwendig, die integrale Intensität zu berechnen (z.B. näherungsweise aus den Linienbreiten und Amplituden der ESR-Signale). Mit Hilfe der ESR-Tomografie konnte belegt werden, dass die Verteilung der Spinsonde in den untersuchten Hautproben von der Struktur der Spinsonde und der Polarität der verschiedenen Hautbereiche abhängt. Dementsprechend konnte für die positiv geladene Spinsonde CAT-1 eine Anreicherung in der oberen Dermis nachgewiesen werden, für die eine erhöhte Polarität im Vergleich zur Epidermis ermittelt wurde. Im Gegensatz zu CAT-1 liegen nach der epikutanen Applikation der amphiphilen Spinsonde TEMPOL im Vergleich zu der oberen Dermis geringfügig erhöhte Konzentrationen der Spinsonde in der Epidermis vor. Sowohl bei der Verwendung von CAT-1 als auch bei der Verwendung von TEMPOL konnte gezeigt werden, dass nach einer Inkubationszeit von mehr als 24 Stunden Unterschiede zwischen den einzelnen epikutan applizierten Liposomenformulierungen messbar sind. Liposomen mit rigiden Membranen führen im Vergleich zu Liposomen mit fluiden Membranen zu höheren Spinsondenkonzentrationen in der Haut und solche aus partialsynthetischen Lipiden zu höheren Konzentrationen als Liposomen aus Sojabohnenlipiden.

Der Vergleich der Penetration von CAT-1 und TEMPOL in die Haut nach epikutaner Applikation von Liposomen mit der Penetration der Spinsonden aus anderen topischen Zubereitungen zeigt, dass eine generelle Aussage zur Penetrationsförderung durch die Anwendung von Liposomen problematisch ist. Durch die zeitabhängige Auswertung der ESR-Signale von CAT-1 in der Haut konnte nachgewiesen werden, dass die Anreicherung der Spinsonde im Bereich der oberen Dermis über 24 Stunden erhalten bleibt. Da die vesikuläre Struktur auf der Hautoberfläche nach epikutaner Applikation der Liposomen verloren geht, kann davon ausgegangen werden, dass dieser Depoteffekt nicht an das Vorhandensein von Liposomen gebunden ist. Durch den Vergleich der zeitabhängigen Entwicklung der Signalintensitäten von CAT-1 nach epikutaner Applikation von dialysierten und undialysierten Liposomen konnte belegt werden, dass zunächst der nicht verkapselte Anteil von CAT-1 in die Haut penetriert, bevor die Spinsonde, die von dem auf der Hautoberfläche entstehenden Lipidfilm eingeschlossen wird, in die Haut eindringt. Im Gegensatz zu CAT-1 führt die epikutane Applikation von TEMPOL auf Hautproben auch ohne Hemmung der reduzierenden Faktoren

zu intensiven ESR-Signalen. Dadurch wird belegt, dass die Penetrationsgeschwindigkeit von TEMPOL höher ist als die Reduktionsgeschwindigkeit in der Haut. Aufgrund der amphiphilen Eigenschaften dieser Spinsonde erfolgt außerdem ihre im Vergleich zu CAT-1 schnellere Penetration in tiefere Hautschichten.

Die Auswirkung von epikutan applizierten Liposomen und anderen topischen Zubereitungen (Lösung, hydrophile Salbe, Mikroemulsion) auf die Polarität der Haut wurde anhand der polaritätsabhängigen Hyperfeinaufspaltung der Spinsonden CAT-1 und TEMPOL ortsabhängig untersucht. Für die Spinsonden wurden mit zunehmendem Abstand von der Hautoberfläche ansteigende Hyperfeinaufspaltungen der ESR-Signale ermittelt, wobei die Polarität im Bereich der Epidermis geringer als in der Dermis ist (s.o.). Der Vergleich der Hyperfeinaufspaltungsprofile von CAT-1 und TEMPOL zeigt, dass eine Veränderung der Polarität der Haut durch epikutan applizierte Liposomen bzw. Mikroemulsion ausgeschlossen werden kann. Dagegen konnten nach der epikutanen Applikation von hydrophiler Salbe geringfügig verminderte Hyperfeinaufspaltungen von TEMPOL nachgewiesen werden, die auf eine Verminderung der Polarität in der Haut durch Bestandteile der hydrophilen Salbe hinweisen. Mit zunehmender Inkubationsdauer konnte allerdings eine ansteigende Hyperfeinaufspaltung des TEMPOL-Signals festgestellt werden, die eine Zunahme der Polarität der Spinsondenumgebung in der Epidermis und Dermis belegt. Eine Ursache dafür könnte ein osmotisch bedingter Einstrom von Wasser in diese Hautschichten sein. Durch einen Vergleich der Hyperfeinaufspaltungen von TEMPOL in Hautproben mit und ohne Enzymhemmung konnte weiterhin nachgewiesen werden, dass die Vorbehandlung der Haut mit N-Ethylmaleinimid zu einem Anstieg der Polarität der Mikroumgebung der Spinsonde führt.

Durch die ortsabhängige Auswertung der Spinsondenmobilität sollten nähere Informationen über Wechselwirkungen zwischen Bestandteilen von epikutan applizierten Liposomen bzw. anderen topischen Zubereitungen und Spinsonden in der Haut erhalten werden. Die Bandbreite der ortsabhängig berechneten Rotationskorrelationszeiten von CAT-1 und TEMPOL in der Haut reicht nach der epikutanen Applikation der Spinsonden in Liposomen von $5,94 \cdot 10^{-9}$ s bis $1,97 \cdot 10^{-9}$ s. Dies entspricht einer Viskosität der Mikroumgebung von CAT-1 bzw. TEMPOL von 118 bis 26 mPa·s. Damit sind die Spinsondenmobilitäten in allen Hautschich-

ten geringer als in wässriger Lösung. Im Vergleich zu CAT-1 sind die Rotationskorrelationszeiten von TEMPOL in der Haut kürzer, was auf die Molekülgeometrie der Spinsonde zurückzuführen ist. Mit zunehmendem Abstand von der Hautoberfläche nimmt die Mobilität der Spinsonden in der Haut zu. Durch einen Vergleich der Rotationskorrelationszeiten nach epikutaner Applikation der Spinsonden in Liposomen bzw. Lösung wurde deutlich, dass diese Mobilitätsunterschiede auf die Strukturen der Haut, insbesondere den mit steigendem Abstand von der Oberfläche zunehmenden Wassergehalt und den Solvatisierungsgrad der Spinsonde zurückzuführen sind. Im Gegensatz zur Applikation von CAT-1 in Liposomen steigt die Mobilität der Spinsonde nach epikutaner Applikation einer Lösung mit zunehmender Versuchsdauer an. Diese entgegengesetzten zeitlichen Entwicklungen sind ein Hinweis auf Wechselwirkungen zwischen Bestandteilen von Liposomen und der positiv geladenen Spinsonde in der Haut. Tendenziell ist die Mobilität der Spinsonde nach Applikation in Liposomenform gegenüber der Mobilität nach Applikation als Lösung, hydrophiler Salbe oder Mikroemulsion jedoch erhöht. Die Rotationskorrelationszeiten bzw. Viskositäten der Mikroumgebung von TEMPOL, die nach der Applikation der Spinsonde in Liposomen bzw. Lösung zeit- und ortsabhängig bestimmt wurden, stimmen nahezu überein. Daraus kann geschlossen werden, dass die Mobilität der ungeladenen Spinsonde in der Haut durch Bestandteile der epikutan applizierten Liposomen nicht verändert wird. Im Unterschied dazu zeigt die Mobilität der Spinsonde CAT-1 in verschiedenen Hautschichten eine Abhängigkeit von den Bestandteilen der epikutan applizierten Liposomen. Während nach der epikutanen Applikation von TEMPOL in hydrophiler Salbe eine zeitabhängige Veränderung der Spinsondenmobilität festgestellt werden konnte, blieb diese nach der Applikation der Spinsonde in Mikroemulsion mit fortschreitender Versuchsdauer nahezu konstant.

5 Materialien und Methoden

5.1 Materialien

5.1.1 Lipidgrundlagen

Zur Herstellung von Liposomen wurden die Sojabohnenlecithine Phospholipon 80 bzw. Phospholipon 80H (Nattermann Phospholipid GmbH) und die partialsynthetischen Lipide Dioleyl- und Dipalmitoylphosphatidylcholin sowie Dipalmitoylphosphatidylglycerol (Lipoid GmbH) verwendet. Nach den Spezifikationen der Hersteller setzen sich die Lipide wie folgt zusammen:

Phospholipon 80: (PC: 74,6 %; Lysophosphatidylcholin: 5,2 %; Ölgehalt: 4,4 %; Kephalin: 1,9 %)

Phospholipon 80H: PC: 70 – 75 %;

Dioleyl-, Dipalmitoylphosphatidylcholin und Dipalmitoylphosphatidylglycerol: >98 %

Neben den Lecithinen wurden die kommerziellen Liposomensysteme Presomen[®] C1 bzw. Presomen[®] PPG-I (Nippon Fine Chemical Co., Ltd., Japan) verwendet. Bei diesen Liposomensystemen handelt es sich um Lipidmischungen, die direkt mit der zu verkapselnden Lösung dispergiert werden und die sich wie folgt zusammensetzen:

Presomen[®] C1: hydriertes Ei-Lecithin (PC 80 %)/Cholesterol (1:1 mol:mol)

Presomen[®] PPG-I: Dipalmitoylphosphatidylcholin/Cholesterol/Dipalmitoylphosphatidylglycerol (1:1:0,2 mol:mol)

5.1.2 ESR-Spinsonden

Die Nitroxylradikale 2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-1-oxyl (TEMPO), 4-Hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl (TEMPOL), 4-Hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxylbenzoat (TEMPOL-benzoat) wurden von Sigma bzw. Aldrich bezogen. 2,2,6,6-Tetramethyl-4-trimethylammoniumpiperidin-1-oxyl-iodid (CAT-1) stammte vom Institut für Organische Chemie der Russischen Akademie der Wissenschaften, Novosibirsk (Russland). 5-2 (4,4-dimethyl-1,3-oxazolidin-3-oxyl) hexadecansäure (5-Doxylpalmitinsäure) wurde in der Arbeitsgruppe synthetisiert.

5.1.3 Fluorophore

Die eingesetzten Fluorophore 1,6-Diphenylhexatrien (DPH) und (1,4-Trimethyl-

ammoniumphenyl)-6-phenyl-1,3,5-hexatrienpropionat (DPH-TMA) wurden von Fluka bezogen.

5.1.4 Weitere Chemikalien

Fluka: Natriumascorbat; Caelo: Cholesterol; Merck: Lösungsmittel (Dichlormethan, Methanol); BDH Chemicals (UK): 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH); Sigma: Zellzuchtmedium (Dulbeccos Modified Eagles Medium), N-Ethylmaleinimid, Kaliumhydrogenphosphat, Dinatriumhydrogenphosphat, Natriumchlorid; Ingold Meßtechnik: pH-Pufferlösungen für Kalibrierzwecke; Hoechst: Halothan[®] Hoechst, Gibco Brl: Agarose

5.2 Analytische Methoden

5.2.1 ESR-Spektroskopie und –Tomografie

Die Elektronenspinresonanzspektroskopie (ESR-Spektroskopie) gehört zur Gruppe der magnetischen Resonanzmethoden. Wie bei jeder anderen Form der Spektroskopie kann ein Spektrum nach Absorption eines bestimmten Energiebetrags entstehen, der im untersuchten System einen Übergang von einem energetisch niedrigen in einen energetisch höheren Zustand erzeugt. Der Betrag der absorbierten Energiemenge lässt sich mit

$$\Delta E = h \nu \quad (10)$$

h: Plancksches Wirkungsquantum

ν : Frequenz

beschreiben.

Das Messprinzip der ESR beruht auf der Absorption von Mikrowellenenergie beim Übergang von Elektronenspins aus einem Grundzustand in einen angeregten Zustand. Dieser Übergang ist durch Aufhebung des entarteten Spin-Zustands durch Anlegen eines homogenen Magnetfelds für Elektronen in unvollständig besetzten Orbitalen möglich. Befindet sich ein solches Elektron in einem magnetischen Feld H^i , kann der Vektor des magnetischen Moments zwei mögliche Orientierungen haben, die mit den zwei möglichen Orientierungen des Spinvektors parallel oder antiparallel zum angelegten magnetischen Feld H korrespondieren.

ⁱ Der Zusammenhang zwischen der häufig in der Literatur verwendeten magnetischen Induktion B und dem magnetischen Feld H ist über die magnetische Permeabilität μ des jeweils im magnetischen Feld befindlichen Materials gegeben: $H = \mu \cdot B$. Im weiteren Text wird zur Beschreibung allgemeiner physikalischer Zusammenhänge das Symbol H verwendet.

Die Spinquantenzahl S eines Elektrons beträgt $\pm \frac{1}{2}$, folglich ist die Energie eines Elektrons in einem magnetischen Feld entweder mit

$$E_1 = +\frac{1}{2}g_e\beta_e H \quad (11)$$

oder

$$E_2 = -\frac{1}{2}g_e\beta_e H \quad (12)$$

zu beschreiben. Diese Energieaufspaltung eines Elektrons durch Anlegen eines magnetischen Feldes bezeichnet man als Zeeman-Aufspaltung. Die Energiedifferenz zwischen den zwei Spin-Zuständen des Elektrons beschreibt

$$\Delta E = E_1 - E_2 = g_e\beta_e H. \quad (13)$$

Die Messung dieser Energiedifferenz ist die Grundlage der ESR-Experimente. Das Anlegen eines Mikrowellenfeldes mit Quanten ($h\nu$) einer Energie gleich $g_e\beta_e H$ in senkrechter Orientierung zum Magnetfeld H bewirkt den Übergang des Elektronenspins zwischen beiden Zuständen [326].

Ein wesentlicher Unterschied zwischen der ESR und der ebenfalls zu den magnetischen Resonanzmethoden gehörenden NMR ist bedingt durch die unterschiedlichen Massen von Kern und Elektron und die damit verbundenden unterschiedlichen magnetischen Momente. Daraus ergeben sich Unterschiede in Bezug auf die zur Anregung erforderlichen Magnetfeld-Frequenz-Kombinationen und auch im Zeitfenster zwischen ESR und NMR. Heute werden in der NMR Frequenzen bis 800 MHz verwendet, während in der ESR der GHz-Bereich dominiert.

Daraus resultieren unterschiedliche „Zeitfenster“ und Empfindlichkeiten der Methoden. Die Anwendung der X-Band-ESR mit Frequenzen um 9 GHz gestattet es, Prozesse vom Mikrosekundenbereich bis in den Pikosekundenbereich zeitlich direkt zu verfolgen. Aus den unterschiedlichen Massen und damit unterschiedlichen magnetischen Momenten von Kern und Elektron ergibt sich eine höhere Empfindlichkeit der ESR, da die Besetzungsunterschiede der Niveaus im thermischen Gleichgewicht der Boltzmannverteilung gehorchen. Von Interesse ist in diesem Zusammenhang, dass sich freie Radikale mit der ESR gegebenenfalls noch im nanomolaren Bereich nachweisen lassen [323].

Bezüglich der **Nachweisgrenze** kann die kleinstmögliche detektierbare Zahl paramagnetischer Zentren N_{\min} durch die folgende Gleichung beschrieben werden:

$$N_{\min} = \frac{3 V_c k_b T_s \Gamma}{2 \pi g^2 \beta_e^2 S(S+1) B_r Q_U} \left(\frac{F k_b T_d b}{P_0} \right)^{1/2} \quad (14)$$

mit

V_c : Volumen des Resonators in m^3 (unter der Annahme, dass ein Rechteckresonator verwendet wird)

k_b : Boltzmann-Konstante in $\text{J} \cdot \text{K}^{-1}$

T_s : Temperatur der Probe in K

Γ : halbe Linienbreite auf halber Höhe einer einzelnen Absorptionslinie in mT

- β_e : Bohrsches Magneton
 S: Spinquantenzahl
 B_r : magnetische Induktion im Zentrum der Absorptionslinie in mT
 Q_U : Güte des unbelasteten Resonators
 T_d : Temperatur des Mikrowellendetektors in K
 b : Bandbreite des gesamten Detektions- und Verstärkungssystems in s^{-1}
 P_0 : Mikrowellenleistung in W
 F: ein Rauschfaktor >1 (im Idealfall sollte $F = 1$ gelten).

Eine Abschätzung nach obiger Gleichung unter der Voraussetzung, dass die Absorptionslinie Lorentzform besitzt, das Curiesche Gesetz gilt und keine Mikrowellensättigung eintritt, ergibt mit typischen Größen einen Wert von $N_{\min} \approx 10^{11}$ Spins. Für eine gewöhnlich verwendete Probe ergibt sich damit eine minimal nachweisbare Konzentration an paramagnetischen Zentren von $\sim 10^{-9}$ M. Solche Werte werden gern von den Herstellern handelsüblicher ESR-Spektrometer zitiert. Oft kommt es schon bei Mikrowellenleistungen über 1 mW zu einem beträchtlichen Sättigungsverhalten, und so ergeben sich schnell sehr viel geringere Empfindlichkeiten [323].

Im Fall der Existenz eines magnetischen Moments (Kernspin $I \neq 0$) des Atomkerns kommt es zu einer Wechselwirkung mit dem ungepaarten Elektron, und die Energieniveaus E_1 und E_2 (Gleichungen 3 und 4) spalten in Abhängigkeit von der Kernspinquantenzahl I in $2I + 1$ Übergänge auf (s. Abb. 121). Aufgrund der Auswahlregel, die nur Übergänge mit $\Delta M_S = \pm 1$ erlaubt (z.B. $-\frac{1}{2} \rightarrow +\frac{1}{2}$, $-1 \rightarrow 0 \rightarrow +1$), ergibt sich für ein ungepaartes Elektron am Stickstoff (^{14}N : $I = 1$) ein Spektrum aus drei symmetrischen Linien, d.h. es werden $2S(2I + 1)$ Übergänge erzeugt.

Die Energieniveaus des Elektrons können also durch Überlagerung des eigentlichen Resonanzfeldes mit den Kernfeldern in folgender Weise beschrieben werden:

$$h\nu = g_e \beta_e H + m_I A \quad (15)$$

m_I Kernspin (für ^{14}N mit $I = 1$ kann m_I die Werte -1 , 0 und $+1$ annehmen)

A Hyperfeinkopplungskonstante (a_N isotrope Hyperfeinaufspaltung am Stickstoffkern)

Diese Form der Aufspaltung des ESR-Signals in mehrere (gleichartige) Linien geht von einer kugelsymmetrischen Verteilung der Ladungen aus, die aber in der Natur nur selten vorkommt. Das trifft auch auf die in den durchgeführten Untersuchungen eingesetzten Spinsonden zu. Ein völlige Gleichartigkeit der drei Linien ist daher nur möglich, wenn keine Anisotropien auftreten können. Dies ist in der Regel gegeben, wenn sich die Spinsonden in niedrigviskosen

Lösungen befinden, in denen die einzelnen Moleküle aufgrund ihrer ungeordneten Bewegung Anisotropien ausmitteln. In einem solchen Fall spricht man von einem **isotropen** Spektrum. Im **anisotropen** Fall werden sowohl der g-Faktor als auch die isotrope Hyperfeinaufspaltungskonstante durch die entsprechenden Kopplungsmatrices \hat{g} und \hat{A} ersetzt [323].

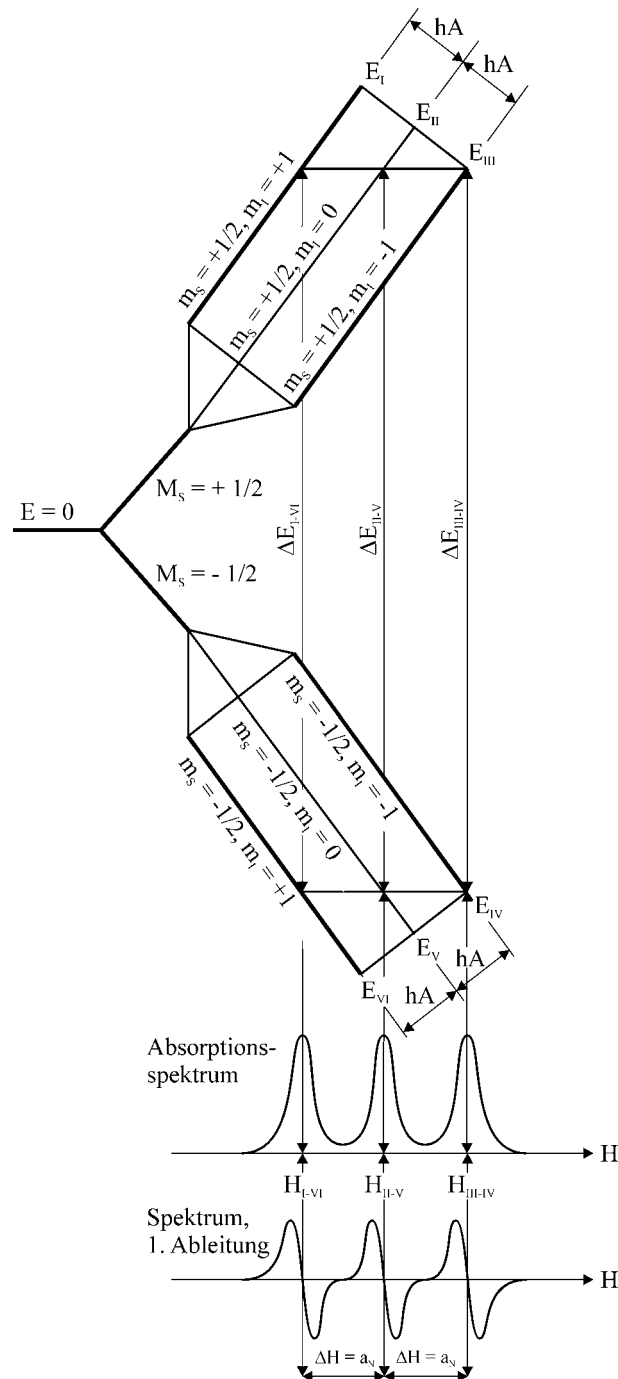


Abb. 121 Aufspaltung der Energieniveaus eines ungepaarten Elektrons ($S = 1/2$) im homogenen Magnetfeld durch Wechselwirkungen mit dem magnetischen Moment eines Stickstoffkerns ($I = 1$) (nach [326])

Diese Betrachtungen sind für die beschriebenen Vorgänge von großer Bedeutung. Da die Hyperfeinkopplungskonstante A die Wechselwirkung zwischen dem Kern- und Elektronenspin widerspiegelt, die energetischen Zustände im Kern aber als konstant betrachtet werden können, ist A ein empfindlicher Parameter für alle Veränderungen in der Spindichte im Molekül. Da das ungepaarte Elektron in erster Linie mit seiner Umgebung wechselwirkt, wird sich jede Veränderung in dieser Umgebung auch auf die Hyperfeinkopplungskonstante auswirken. Diesen Umstand macht man sich insbesondere bei der Untersuchung biologischer Objekte mit Hilfe von stabilen Radikalen (meist Nitroxide) als Reportermoleküle zunutze.

So lassen sich z.B. anisotrope Spektren von Spinsondenlösungen unter Berücksichtigung der **Viskosität** des Lösungsmittels interpretieren. Aus der Kenntnis heraus, dass sich anisotrope ESR-Signale von Spinsonden in Lösungen geringer Viskosität aufgrund der Braunschen Molekularbewegungen ausmitteln (es sind drei schmale Linien gleicher Intensität zu beobachten), kann eine beginnende anisotrope Aufspaltung als Maß für die Behinderung der Rotation des Spinsondenmoleküls und damit der Viskosität des Lösungsmittels verwendet werden. Da nur die Lösungsmittelmoleküle in unmittelbarer Umgebung der Spinsonde mit dieser wechselwirken, hat diese Methode den Vorteil, dass man eine Information über die molekulare Umgebung der Sonde in Form einer **Mikroviskosität** erhalten kann. Aus dem ESR-Spektrum lässt sich die **Rotationskorrelationszeit** τ_R ermitteln, die über die Stokes-Einsteinsche Beziehung

$$\tau_R = \frac{4\pi \cdot \eta \cdot a^3}{3 \cdot k \cdot T} \quad (8)$$

mit der Viskosität in Verbindung steht. Mit Hilfe einer empirischen Beziehung

$$\tau_R = 6.5 \cdot 10^{-10} \Delta B_0 (\sqrt{h_0/h_{-1}} - 1) \quad (1)$$

ΔB_0 Linienbreite der mittleren Linie

h_0/h_{-1} Intensitätsverhältnis der mittleren zur Hochfeldlinie des Drei-Linien-Spektrums

lassen sich in vereinfachter Weise die Rotationskorrelationszeiten aus den ESR-Spektren ermitteln.

In Abb. 122 ist ein Beispiel für eine solche Untersuchung dargestellt. Die Abschätzung der Werte der Rotationskorrelationskoeffizienten ergab $1,3 \cdot 10^{-10}$ s bei 278 K. Die Viskosität der Mikroemulsion ist selbst bei 278 K noch ausreichend, die freie Beweglichkeit des Moleküls einzuschränken und eine partielle Anisotropie des Spektrums zu bewirken. Genauere Werte lassen sich mit Hilfe der von *Budil et al.* [315] entwickelten Algorithmen auch aus anisotropen Spektren (vgl. 171 K) ermitteln.

Eine Möglichkeit der Beeinflussung der Spindichteverteilung am ungepaarten Elektron ist durch die **Polarität** des Lösungsmittels gegeben. Apolare Lösungsmittel erhöhen die Spindichte am Stickstoff der NO-Gruppe und führen zu einer Verringerung der Hyperfeinkopplungskonstante (siehe Abb. 123). Wie bereits oben erwähnt, haben nur die Lösungsmittelmoleküle in unmittelbarer Nachbarschaft zur Spinsonde Einfluss auf die Wechselwirkungen zwischen Kern- und Elektronenspin. Auf diese Weise ist es möglich, aus den ESR-Spektren Aussagen zur **Mikropolarität** in der Umgebung der Spinsonde zu

gewinnen. Dieses Prinzip gestattet die Charakterisierung von O/W- bzw. W/O-Systemen mit Hilfe von amphiphilen Spinsonden, die sich entsprechend ihrer physikochemischen Eigenschaften verteilen. Aufgrund der dramatischen Veränderungen der Verteilung dieser Sonden im Bereich der Phasenübergangstemperaturen von Lipiden lässt sich dieser wichtige Parameter mit Hilfe der ESR erfassen.

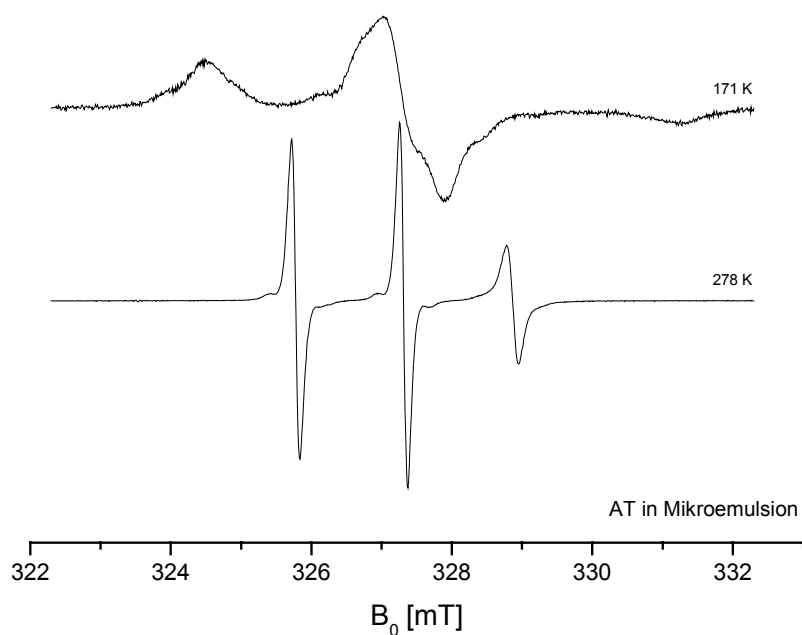


Abb. 122 ESR-Spektren der Spinsonde 4-Amino-2,2,5,5-tetramethylimidazolin-1-oxyl (AT) in einer Mikroemulsion bei verschiedenen Temperaturen

In gleicher Weise ist es möglich, Informationen über den **pH-Wert** in der unmittelbaren Umgebung der Spinsonde zu erhalten. Voraussetzung dafür ist die Existenz einer Spinsonde, die ihre Hyperfeinaufspaltung in Abhängigkeit vom Protonierungsgrad ändert.

Aus der Vielzahl der oben beschriebenen Einflussfaktoren auf die Hyperfeinkopplungskonstante muss aber auch abgeleitet werden, dass vor der Verwendung einer speziellen Spinsonde deren physikochemischen Eigenschaften sehr genau ermittelt werden müssen, um Überlagerungseffekte von Polaritäts-, Viskositäts- und pH-Wert-Einflüssen für das entsprechende Experiment auszuschließen oder zumindest ihren quantitativen Anteil bestimmen zu können.

Die Synthese stabiler Nitroxylradikale mit speziell auf bestimmte Einsatzgebiete abgestimmten physikochemischen Eigenschaften ist somit Voraussetzung für die Erweiterung der Anwendungsbreite der ESR (vgl. hierzu [327]) und deren Einsatz bei der nichtinvasiven

Bestimmung lokaler Eigenschaften von Arzneiträgersystemen, die mit anderen Methoden nicht zugänglich sind.

Ein entscheidender Vorteil der ESR für all diese Untersuchungen ist die problemlose Anwendbarkeit bei farbigen, festen und nicht transparenten Proben. Ihre Selektivität erspart oft aufwendige Probenvorbereitungen und ermöglicht *In-vivo*-Messungen. Darüber hinaus ist die Systemstörung durch die ESR bei niedrigen Mikrowellenleistungen als sehr gering einzuschätzen. Diese Vorteile sind Voraussetzung für alle im Teil „Untersuchungen, Ergebnisse und Diskussion“ aufgeführten Untersuchungen an biologischen Proben.

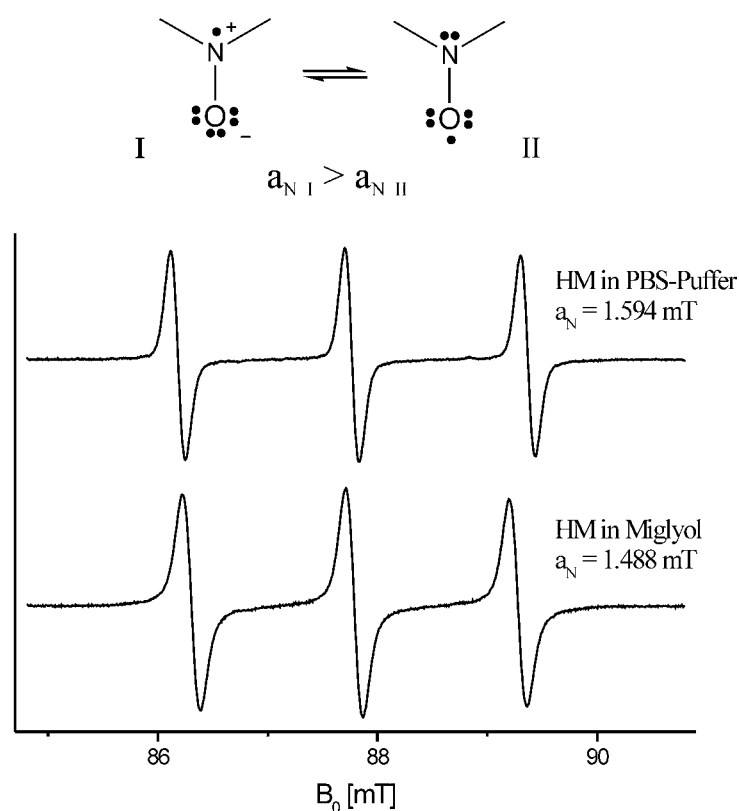


Abb. 122 S-Band-ESR-Spektren der Lösungen von 2,2,3,4,5,5-Hexamethyl-imidazolidin-1-oxyl (HM) in Lösungsmitteln mit unterschiedlicher Polarität

Neuere Entwicklungen gestatten die zerstörungsfreie Aufnahme mehrdimensionaler spektral, zeitlich bzw. räumlich aufgelöster ESR-Spektren. Somit ist es prinzipiell möglich, am lebenden biologischen System an einem bestimmten Ort nichtinvasiv kinetische Prozesse direkt zu verfolgen. Weitere Fortschritte der ESR sind durch die Anwendung von Pulsmethoden zu erwarten [328].

Messfrequenzen

Standard-ESR-Spektrometer arbeiten bei Frequenzen von 9.5 GHz (X-Band) und einer applizierten magnetischen Induktionsflussdichte von $B_0 = 0.34$ T. Höhere Empfindlichkeiten werden mit Spektrometern erzielt, die bei einer Mikrowellenfrequenz von 35 GHz und B_0 von 1,2 T (Q-Band) arbeiten. X- und Q-Band-ESR sind klassische Methoden der Festkörperanalytik. Bei einer Erhöhung der Messfrequenz muss aber gleichzeitig die Größe des Resonators (wenn er im gleichen Modus arbeiten soll) verringert werden. Wird dann die Probengröße im gleichen Verhältnis reduziert und bleibt der Füllfaktor bei gleichem dielektrischen Verlust annähernd konstant, erhöht sich die Empfindlichkeit um den Faktor $v^{3/2}$. Bei größeren dielektrischen Verlusten ist der Empfindlichkeitsgewinn deutlich kleiner und kann sogar negative Werte annehmen. Gleiches trifft zu, wenn die Probe eine starke Mikrowellensättigung aufweist.

Die Optimierung des Signal-Rausch-Verhältnisses eines ESR-Spektrometers ist häufig die Voraussetzung für die erfolgreiche Durchführung eines ESR-Experiments. Dies schließt eine Optimierung der verschiedenen elektronischen Komponenten des Spektrometers ein [329].

Bei den in den letzten Jahren zunehmenden Anwendungen der ESR-Spektroskopie für Untersuchungen in biologischen Systemen (Zellkulturen, subzelluläre Fraktionen, Gewebeschnitte, ganze Tiere usw.) kommen zunehmend Frequenzen von 3 GHz (S-Band; $B_0 \sim 0.1$ mT), 1 GHz (L-Band; $B_0 \sim 0.04$ mT) und sogar Radiofrequenzen um 250 MHz ($B_0 \sim 0.01$ mT) zum Einsatz. Die Verwendung solch niedriger Frequenzen ist im wesentlichen durch die Art der Proben (speziell unter dem Aspekt der Eingrenzung der resultierenden dielektrischen Verluste) bestimmt.

Anforderung an die Proben und Eindringtiefe der elektromagnetischen Strahlung

In ihrer klassischen Form arbeitete die ESR-Spektroskopie mit einer Punktprobe, die die Ankopplung des Resonators nicht oder kaum veränderte, d.h. man widmete sich häufig kristallinen Festkörpern mit weitgehend homogener Zusammensetzung und geringer Abmessung, die eine geringe Mikrowellendämpfung haben. Biologische Proben bewirken durch ihren hohen Wassergehalt starke dielektrische Verluste und sind darüber hinaus oft von solcher Größe, dass ihr Volumen die Beladungskapazität gängiger Resonatoren übersteigt. Man musste also auf solche Frequenzbereiche ausweichen, die in geringerem Maße von den Dämpfungseigenschaften der Proben abhängig waren. Das trifft auf die S-Band-, L-Band- und RF-ESR zu. Es sei angemerkt, dass auch die Eindringtiefe der elektromagnetischen Strahlung eine besondere Rolle spielt. Geht man davon aus, dass bei X-Band-Frequenzen die Eindringtiefe etwa bei 1 mm liegt, dann beträgt sie bei 3 GHz (S-Band) etwa 3 mm, bei 1 GHz (L-Band) ca. 1 cm und bei Radiofrequenzen etwa 5 cm. Mit anderen Worten, bei der Untersuchung biologischer Proben spricht auch die erforderliche Eindringtiefe der elektromagnetischen Strahlung für die Verwendung von Frequenzen unterhalb des X-Bandes.

Es sei an dieser Stelle angemerkt, dass die Empfindlichkeit des Spektrometers wie oben erwähnt mit abnehmender Frequenz sinkt. Dieser Verlust an Empfindlichkeit kann aber durch das größere Probenvolumen zum Teil kompensiert werden.

ESR-Tomografie

Alle bisher angeführten Bemerkungen zu den methodischen Grundlagen der ESR-Spektroskopie gelten selbstverständlich auch für die ESR-Tomografie. Im Unterschied zur eindimensionalen Spektroskopie ist für die räumlich aufgelöste ESR-Spektroskopie (ESR-Tomografie) die Aufnahme eines Satzes von ESR-Spektren (Projektionen) mit einer räumlichen Kodierung erforderlich. Dieser wird durch eine genau definierte Inhomogenität des Magnetfelds (Feldgradient) für jedes der einzelnen Spektren des Gesamtsatzes gewonnen.

Die Aufnahme von Tomogrammen mit spektral-räumlicher Auflösung basiert auf den von Maltempo und Mitarbeitern formulierten Grundlagen [330 - 333] und erfordert den Einsatz eines sogenannten gradierten Feldgradienten. Die so erhaltenen Tomogramme zeigen somit ESR-Spektren als Funktion einer räumlichen Koordinate. Ein spektral-räumliches Experiment für ein Objekt mit der Ausdehnung L in räumlicher und ΔH in spektraler Richtung kann wie in Abb. 123 beschrieben werden. Dabei entspricht das ESR-Spektrum bei einem spezifischen Wert des Gradienten einer Ansicht des Objekts aus einem bestimmten Projektionswinkel α . Dieser Winkel ist in Bezug zur spektralen Achse definiert. So entspricht ein Winkel mit $\alpha = 0^\circ$ einem Null-Gradienten und $\alpha = \pm 90^\circ$ jeweils einem unendlich großen Gradienten. Auf diese Weise enthalten alle zwischen diesen Werten liegenden Projektionen eine Kombination von spektraler und räumlicher Information.

Die erforderlichen Feldgradienten werden mittels der sogenannten Gradientenspulen nach der Formel

$$G_\alpha = \tan(\alpha) \Delta H / L \quad (16)$$

für die Aufnahme eines kompletten Satzes von Projektionen variiert. Um das Objekt abbilden zu können, muss neben dieser Variation des Feldgradienten aber auch die Sweepweite im Verlauf des Experiments geändert werden, wie leicht aus Abb. 124 ersichtlich ist. Sie folgt in ihrem Verlauf der Gleichung

$$\text{Sweepweite} = \sqrt{2} \Delta H / \cos(\alpha) \quad (17).$$

Da es nicht möglich ist, einen unendlich großen Feldgradienten zu erzeugen, wird der Maximalstrom durch die entsprechende Spulenkonstruktion limitiert und damit die zur Berechnung eines Tomogramms erforderlichen Projektionen um genau die Zahl verringert (missing projections), deren technische Realisierung aus apparativen Gründen ausgeschlossen ist. Diese fehlenden Projektionen werden durch den Verlauf der tatsächlich gemessenen

Projektionen extrapoliert [334].

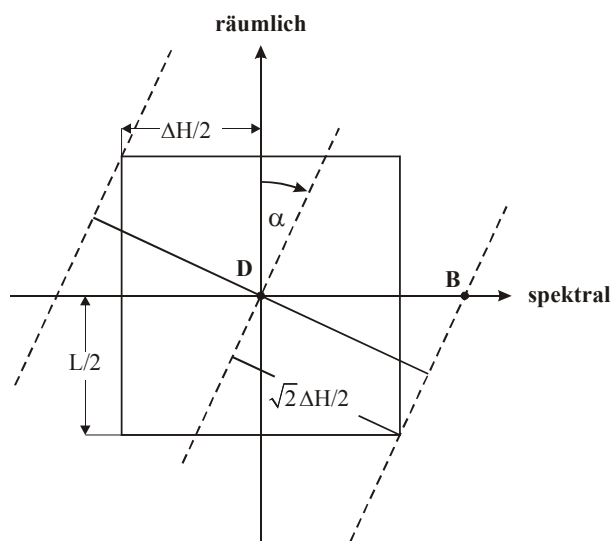


Abb. 124 Skizze eines spektral-räumlichen Experiments mit einem Pseudoobjekt der Dimension $\Delta H \times L$ (die gestrichelten Linien zeigen Ecken und Zentrum bei einem Projektionswinkel α ; nach [333])

Für die im folgenden beschriebenen Tomogramme wurden jeweils 95 Projektionen (davon 12 missing projections) aufgenommen. Aus diesem Satz von Projektionen wird mittels gefilterter Rückprojektioneine Matrix von 256 x 256 Punkten berechnet, die dann zur weiteren Auswertung zur Verfügung steht. Bei der Aufnahme des Satzes von Projektionen mit einem graduierten Feldgradienten enthält diese Matrix somit einen Satz von 256 Spektren mit jeweils 256 Punkten.

An dieser Stelle sei auf eine Besonderheit der hier angewandten ESR-Tomografie hingewiesen. Während in der ESR-Spektroskopie üblicherweise die erste Ableitung des Absorptionssignals registriert wird, fallen nach der Rückkonstruktion die Signale in ihrer integrierten Form an.

Im nächsten Schritt der Auswertung dieser Tomogramme wird die gewonnene Punktematrix erneut in individuelle Spektren zerlegt, denen jeweils eine bestimmte Tiefe (Schnittebene) zugeordnet wird (s.u.). Diesen Spektren werden dann die gewünschten Informationen entnommen (s. Abb. 125), z. B. kann bei dem Einsatz von pH-sensitiven Spinsonden aus der Hyperfeinaufspaltung a_N der Spektren auf den pH-Wert in der jeweiligen Schnittebene geschlossen werden. Die quantitative Untersuchung der Veränderungen im spektralen Habitus (Isotropie/Anisotropie) erlaubt die Bestimmung von Mikroviskositäten, und Veränderungen in der Aufspaltung lassen Schlüsse auf Mikropolaritäten und somit auf die Verteilung zwischen wässrigen und lipophilen Phasen zu.

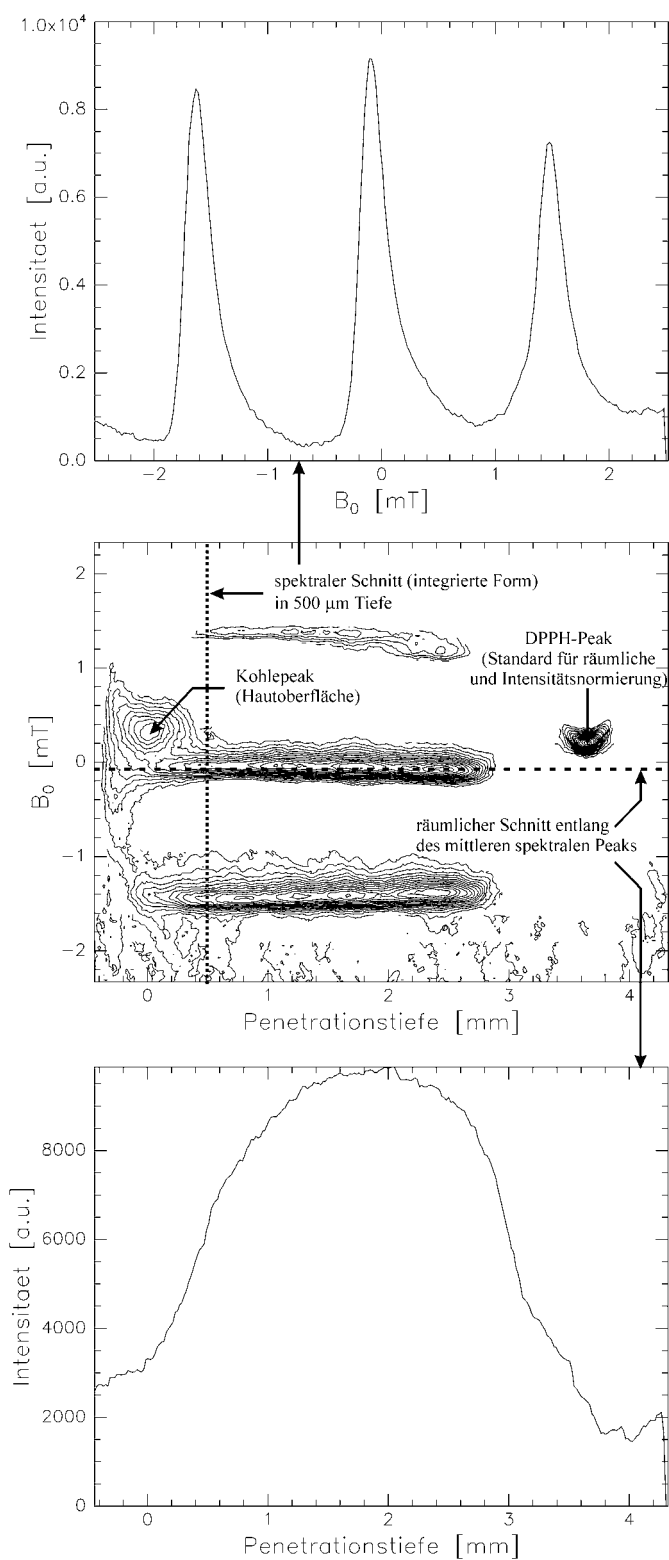


Abb. 125 Schematische Darstellung der Gewinnung von Informationen aus einer Rückkonstruktionsmatrix von 256 x 256 Punkten

Die räumliche Skalierung wird mit Hilfe zweier ESR-Standards (Kohle als Suspension nach Abschluss der Penetrationsstudien auf die Probenoberfläche aufgetragen und α -Diphenyl-

picrylhydracyl [DPPH] auf dem Quarzträger befestigt) ermittelt. Das DPPH dient darüber hinaus noch als Intensitätsstandard.

Die Tomografieexperimente an Hautproben wurden ausnahmslos in einer modifizierten Gewebezelle durchgeführt (s. Abb. 126). Dabei befand sich die Probe in einem abgeschlossenen Volumen (die Halterungen zur Fixierung im Resonator waren aus Quarzstäben hergestellt). Die Temperatur der Probe konnte durch Temperierung des kompletten Resonators auf Temperaturen zwischen 5 und 38 °C geregelt werden. Für die Experimente an Hautproben wurde konstant eine Temperatur von 32 °C eingestellt.

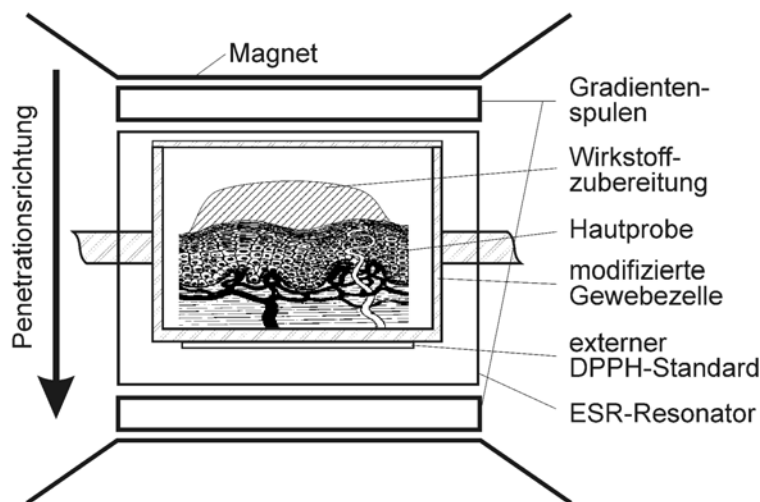


Abb. 126 Probenanordnung für die Untersuchungen mit spektral-räumlicher ESR-Tomografie an exzidiert tierischer und menschlicher Haut

Die Bestimmung der Penetrationstiefe von Spinsonden in der Haut erfordert die Markierung einer Ausgangsposition, die in den durchgeführten Untersuchungen der Applikationsstelle entspricht und mit der Hautoberfläche identisch ist. Das Spinsondensignal selbst ist für diesen Zweck aus verschiedenen Gründen ungeeignet. Für die Tomografieexperimente war es erforderlich, eine (paramagnetische) Markierung der Hautoberfläche zu finden, die neben dem Signal der aufgetragenen Spinsonde klar erkennbar sein musste.

Als paramagnetischer Marker wurde Zuckerkohle ausgewählt, die sich durch ein Ein-Linien-Signal auszeichnet. Der partikuläre Zustand der Kohle verhindert das Eindringen in das SC und damit eine eventuelle Verfälschung der Dickenbestimmung. Notwendig ist allerdings die Verwendung von Zuckerkohlen mit definierter Partikelgröße, da der Ausgangspunkt für die Dickenbestimmung das Signalmaximum ist. Je größer die Partikel sind, desto weiter ist das Signalmaximum der Kohle von der Hautoberfläche entfernt. Als Folge ergibt sich eine Überbestimmung der Penetrationstiefe. Dies kann durch die Verwendung von mikronisierter Kohle, die in Aceton suspendiert wurde, vermieden werden. Die Partikelgröße der Kohle wurde mittels Ultraschall-Behandlung auf 30 µm eingestellt. Nach der Applikation auf die Hautprobenoberfläche bildete sich ein Kohlepartikelfilm, der im Tomogramm als Ein-Linien-

Signal detektiert wurde und dessen Peakmaximum dicht über der Hautoberfläche liegt. Die Dispersion der mikronisierten Kohle in Aceton wurde prinzipiell nach Abschluss der Penetrationsversuche aufgetragen, so dass eine mögliche physiologische Veränderung der Hautprobe durch das Lösungsmittel nicht relevant war.

5.2.2 Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS)

Die Photonenkorrelationsspektroskopie ist ein dynamisches Streulichtverfahren zur Analytik von Partikelgrößen im Bereich von 5 nm bis 3 µm [335]. Ausgewertet werden zeitabhängige Schwankungen der Intensität von Laserlicht. Dieses streut an Partikeln, die sich aufgrund der Brown'schen Molekularbewegung im Messmedium bewegen.

Die Veränderungen der Laserlichtintensitäten $I(t)$ werden detektiert und die Autokorrelationsfunktion $G(\tau)$ für das Messintervall τ erstellt:

$$G(\tau) = I(t) \cdot I(t + \tau) \quad (18)$$

Diese wird an eine theoretische Korrelationsfunktion mit Hilfe der Kummulanten-Analyse angepasst:

$$g(\tau) = e^{-2DK^2\tau} \quad (19)$$

g(t): Korrelationsfunktion
 D: Diffusionskoeffizient der Partikel
 K: Betrag des Streulichtvektors
 τ: Verzögerungszeit

Mit Hilfe der Stoke-Einstein-Beziehung lässt sich aus dem Diffusionskoeffizienten und der Viskosität der Partikelradius errechnen:

$$r = \frac{k \cdot T}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot D} \quad (20)$$

r: Partikelradius
 k: Boltzmann-Konstante
 T: absolute Temperatur
 η: dynamische Viskosität
 D: Diffusionskoeffizient

Neben dem mittleren Teilchendurchmesser wird bei der Anpassung der Autokorrelationsfunktion an die theoretische Funktion der Polydispersitätsindex (PI) berechnet. Der PI ist ein Maß für die Größenverteilungsbreite der Teilchen. Er kann in Abhängigkeit von der Verteilungsbreite Werte zwischen 0 und 1 annehmen (vgl. Tab. 12).

Tabelle 12 Einteilung der Größenverteilungsbreite anhand des Polydispersitätsindex nach [336]

Polydispersitätsindex (PI)	Größenverteilung
0.030 bis 0.060	unimodal
0.100 bis 0.200	eng
0.250 bis 0.500	breit
über 0.500	multimodal

Die Messungen erfolgten mit einem Zetasizer 4 (Malvern Instruments, UK). Um Mehrfachstreuungen in konzentrierten Dispersionen zu vermeiden, wurden diese vor der Vermessung bis zur schwachen Opalessenz verdünnt. Jeweils 12,5 µl (P80H/CH, DPPC/CH/PG) bzw. 25 µl (P80/CH, DOPC/CH/PG) der Zubereitungen wurden mit isoosmolarem Puffer zu 10 ml aufgefüllt. Jede Probe wurde drei Mal vermessen, wobei jede Messung aus zehn Einzelmessungen à 20 s bestand. Der Messwinkel betrug 90°.

5.2.3 Zetapotenzialmessung mittels Laser Doppler Anemometrie (LDA)

Das Zetapotenzial (ξ) dient der Abschätzung der physikalischen Stabilität von Partikeldispersionen. Es ist definiert als das unter Einwirken eines elektrischen Feldes an der Scherebene messbare Potenzial eines diffundierenden Teilchens. Die Scherebene befindet sich zwischen der diffusen Schicht aus nicht-fixierten beweglichen Ionen, die das diffundierende Teilchen umgeben, und dem umgebenden Medium. Ausführliche Erklärungen des Zetapotenzials finden sich in der Literatur [337]. Die für mineralische Suspensionen vorgenommene Einteilung (vgl. [337]) wurde auf Liposomen übertragen (vgl. Tab. 13).

Tab. 13 Klassifizierung der Stabilität mineralischer Suspensionen anhand des Zetapotenzials nach [337]

Kennzeichen der Stabilität	Zetapotenzial (mV)
gute Stabilität	+ 60 bis + 80
obere Grenze der Ausflockung	+ 3 bis + 5
maximale Ausflockung	- 5 bis +3
untere Grenze der Ausflockung	- 10 bis - 15
mäßige bis mittlere Stabilität	- 30 bis - 60
sehr gute Stabilität	- 61 bis - 80
extrem gute Stabilität	- 81 bis - 100

Die Bestimmung des Zetapotenzials erfolgt nach dem Prinzip der Laser Doppler Anemometrie. Geladene Teilchen, die sich in einem elektrischen Feld bewegen, führen zu einer Lichtstreuung im Interferenzfeld aus zwei sich kreuzenden Laserstrahlen. Aufgrund des Dopplereffekts kommt es zu einer Frequenzverschiebung des gestreuten Lichtstrahls. Die Größe der Frequenzverschiebung ist dabei abhängig von der Geschwindigkeit des Partikels. Da die Laserstrahlen eine unterschiedliche Frequenz aufweisen, entsteht im Schnittpunkt kein stationäres, sondern ein in Richtung der Interferenznormalen wanderndes Interferenzfeld, so dass nicht nur die Partikelgeschwindigkeit, sondern auch die Bewegungsrichtung der Partikel bestimmt werden kann. Die elektrophoretische Mobilität wird nach der Berechnung von

Helmholtz-Smoluchowski in das Zetapotenzial konvertiert. Aus der Bewegungsrichtung der Teilchen im elektrischen Feld wird das Vorzeichen des Zetapotenzials bestimmt.

Die Bestimmungen erfolgten im Originaldispersionsmedium (Phosphatpuffer, 140 mM) mit einer Leitfähigkeit von 14,5 mS/cm bzw. in destilliertem Wasser, dass mit Natriumchlorid auf eine Leitfähigkeit von 50 μ S/cm eingestellt wurde.

5.2.4 Fluorimetrie

Bei Fluoreszenzpolarisations-Messungen wird die Änderung der Polarisationssebene des emittierten Lichts durch membrangebundene oder in die Membran eingelagerte Fluorophore als ein Maß für die Beweglichkeit der Substanz während der Lebenszeit des angeregten Zustandes genommen [vgl. 238]. Aus der Beweglichkeit des Fluorophors und den daraus resultierenden Polarisationsindizes kann wiederum auf die Mikroviskosität der Membranen geschlossen werden. Der Polarisationsindex P errechnet sich nach Gleichung (1) aus dem Verhältnis der emittierten Lichtintensitäten, die parallel (I_{\parallel}) bzw. senkrecht (I_{\perp}) zur Polarisationsrichtung des eingestrahnten Lichts detektiert werden:

$$P = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + I_{\perp}} \quad (4)$$

Die eingesetzten Fluorophore (s. Abb. 127) 1,6-Diphenylhexatrien (DPH) und 1,4-Trimethylammoniumphenyl-6-phenyl-1,3,5-hexatrienpropionat (DPH-TMA) nehmen in Abhängigkeit von ihrer Struktur unterschiedliche Positionen in den polaren und apolaren Bereichen der liposomalen Doppelmembranen ein und geben Auskunft über die zugehörigen Membranfluiditäten.

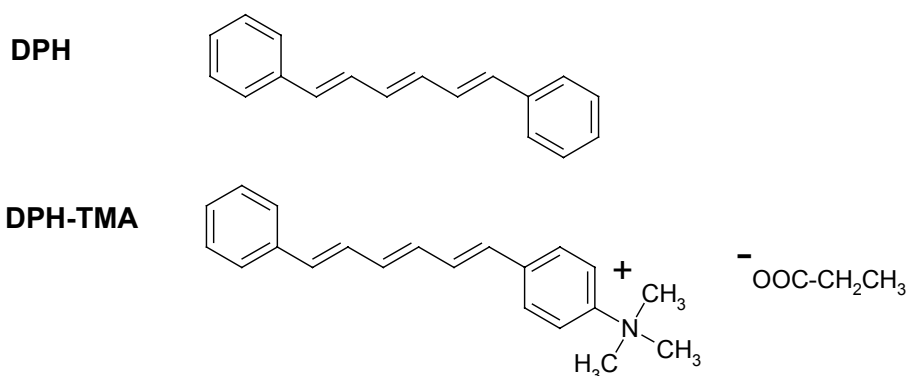


Abb. 127 Fluoreszenzmarker 1,6-Diphenylhexatrien (DPH) und (1,4-Trimethylammoniumphenyl)-6-phenyl-1,3,5-hexatrienpropionat (DPH-TMA)

Vor allen Messungen wurden die Maxima der Anregungs- und Emissionsspektren der

Fluoreszenzmarker in den jeweiligen Zubereitungen bestimmt, und die in Tab. 14 aufgeführten Anregungs- bzw. Emissionswellenlängen für alle Messungen festgelegt.

Tab. 14 Anregungs- (λ_{ex}) und Emissionswellenlängen (λ_{em}) der Fluoreszenzmarker DPH und DPH-TMA

Fluoreszenzmarker	λ_{ex} (nm)	λ_{em} (nm)
DPH	354	428
DPH-TMA	360	435

Die Versuche wurden wie in der Literatur beschrieben durchgeführt [238, 338]. Dazu wurden 2 ml der liposomalen Zubereitungen nach 2.000-facher Verdünnung mit jeweils 10 μl einer Lösung der Fluoreszenzmarker DPH bzw. DPH-TMA (10^{-3} molar) versetzt. Die Zeit, die der Indikator benötigt, um sich in den Membranen der Liposomen zu verteilen wurde an ausgewählten Liposomenformulierungen bestimmt. Die Verteilung gilt als abgeschlossen, wenn die Fluoreszenzintensität nahezu konstant bleibt. Diese sogenannte Ausgleichszeit wurde auf 5 min festgelegt (Abb. 128) Nach dem Ablauf der Ausgleichszeit erfolgte die Bestimmung des Polarisationsindex P mit dem Lumineszenz-Spektrometer LS 50 (Perkin-Elmer, Deutschland).

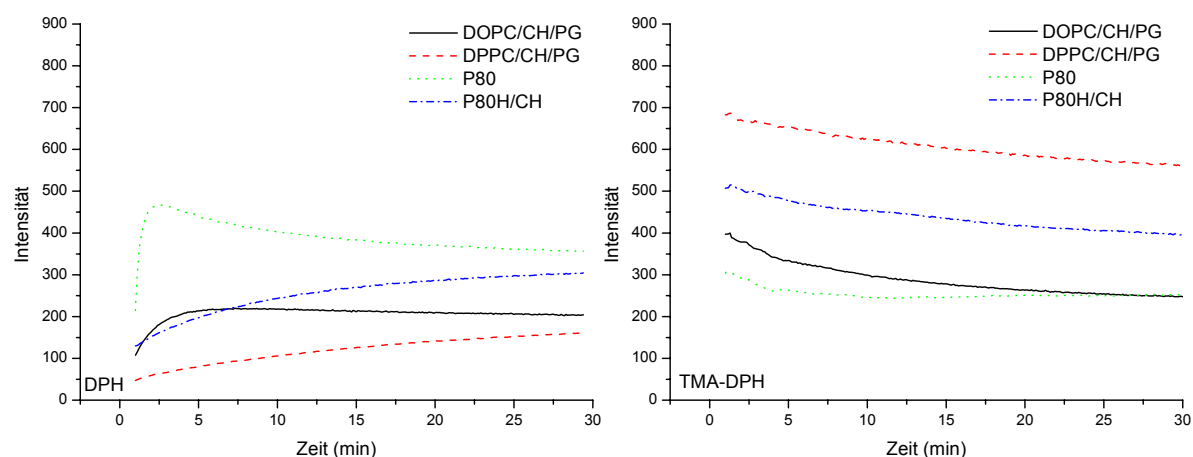


Abb. 128 Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Zeit nach der Zugabe von DPH (links) bzw. DPH-TMA zu den Liposomenformulierungen DOPC/CH/PG (6,5:3:0,5), DPPC/CH/PG (4,1:5:0,9), P80 und P80H/CH (7:3)

5.2.5 Laserdiffraktometrie

Grundlage der Laserdiffraktometrie ist die Beugung des Lichts an dispergierten Teilchen. Zur Erzeugung von Beugungsbildern wird ein Lichtstrahl mit Hilfe eines optischen Systems aufgeweitet. An den Teilchen im Messmedium kommt es zu einer Beugung des Lichtstrahls und zur Erzeugung von radialsymmetrischen Beugungsbildern. Diese werden unabhängig von der Position des Teilchens durch eine nachgeschaltete Fourierlinse immer auf dieselbe Position eines Multielement-Detektors gelenkt. Die Beugungswinkel kleiner Teilchen sind aufgrund der starken Krümmung ihrer Oberfläche groß, und führen zu einer hohen Intensität

des gebeugten Lichts auf den äußeren Sektoren des Detektors. Große Teilchen verhalten sich dementsprechend umgekehrt. Zur Auswertung der Partikelgrößen und -verteilungen werden häufig die Mie- bzw. die Fraunhofertheorie herangezogen. Letztere setzt sphärische Partikel mit einem Durchmesser voraus, der deutlich über der Wellenlänge des verwendeten Laserlichts liegt ($d \geq 4\lambda$). Bei Verwendung eines Helium-Neon-Lasers mit einer Wellenlänge sollten die zu vermessenden Teilchen einen Durchmesser von mindestens 2,4 μm aufweisen. Die Mie-Theorie hingegen kann bei der Vermessung von Partikeln mit kleineren Durchmessern herangezogen werden. Bei Verwendung der Mie-Theorie ist die Kenntnis eines realen Brechungsindex und eines Absorptionswerts der dispergierten Teilchen notwendig, wobei der Absorptionswert als imaginärer Brechungsindex bezeichnet wird. Nach Herbort [339] wurde für alle Messungen ein realer Brechungsindex von 1,46 und ein imaginärer Brechungsindex von (0,001) angenommen.

Für die durchgeführten Messungen wurde ein Coulter LS 230 verwendet. Dieses Gerät ist mit der Polarization Intensity Differential Scattering Technology (PIDS) ausgestattet und erweitert den gewöhnlichen Messbereich von 100 nm bis 2000 μm im unteren Bereich bis auf 40 nm. Die Messungen erfolgten im wässrigen Dispersionsmedium, wobei die notwendigen Volumina, die benötigt wurden, um eine ausreichende Intensität des gestreuten Lichts detektieren zu können, stark von der vermessenen Probe abhängig waren. Die Volumenverteilungen werden in Abhängigkeit vom Durchmesser der Teilchen angegeben. So bedeutet der Durchmesser LD (50 %) bzw. LD (90 %), dass 50 % bzw. 90 % der detektierten Teilchen einen kleineren Durchmesser als den genannten aufweisen.

5.3 Untersuchungsmethoden

5.3.1 Herstellung von Liposomen

Die Herstellung von Liposomen erfolgte unter Verwendung von Lipidmischungen der unter 6.1 genannten Phospholipide und Cholesterol. Diese wurden in den entsprechenden Verhältnissen in einer Menge von ca. 2 g in einem Rundkolben eingewogen und anschließend in 10 ml einer Mischung aus Dichlormethan und Methanol (2:1), gelöst. Das Methanol wurde unter Verwendung eines Rotationsverdampfers bei 45 °C weitgehend aus der Lipidmischung entfernt. Zur Beseitigung evtl. vorhandener Lösungsmittelreste und Wasser wurden die Lipidmischungen 24 Stunden gefriergetrocknet.

Kleine Mengen der Lipidmischungen (bis 50 mg) wurden aus Stammlösungen der einzelnen Bestandteile angefertigt. Dazu wurden DOPC, DPPC, P80, P80H (60 mg/ml) bzw. Cholesterol (60 mg/ml) in Dichlormethan/Methanol (1:2 bzw. 2:1) und Phosphatidylglycerol (6 mg/ml) in Methanol gelöst. Anschließend wurden die Lösungen in den entsprechenden Verhältnissen in Eppendorfgläser pipettiert, das Lösungsmittel abgedampft und die Lipidmischungen gefriergetrocknet.

Zur Herstellung von multilamellaren Liposomen wurden in der Regel 50 mg/ml der Lipidgrundlage in ein Eppendorfglas eingewogen bzw. die Mischungen mit der entsprechenden Menge Hydratisierungsmedium aufgefüllt. Als Hydratisierungsmittel zur Herstellung von unbeladenen Liposomen diente ein Phosphatpuffer (pH 7,4) folgender Zusammensetzung: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (1,44 g/1000 ml), KH_2PO_4 (0,2g/1000 ml), NaCl

(7,61g/1000 ml). Die Osmolarität des Puffers betrug 276 mOsmol/kg und wurde mit einem Knauer Osmometer Automatic überprüft. Die Überprüfung des pH-Werts erfolgte mit einem Knick, pH-Meter 763 Multi Calimatic, mit Einstabmesskette (Schott-Glaselektrode Z451). Die Herstellung von beladenen Liposomen erfolgte durch die Hydratisierung der Lipidgrundlagen mit Lösungen der verwendeten Spinsonden. Zur Vermeidung von osmotischen Effekten nach der Verkapselung von Spinsonden-Lösungen in Liposomen wurden die Hydratisierungsmedien auf eine Osmolarität von 276 mOsmol/kg eingestellt. Dazu wurde der Standard-Phosphatpuffer verwendet, und die Konzentration (mol/l) an NaCl entsprechend der Konzentration (mol/l) der Spinsonde reduziert. TEMPOL-benzoat wurde, nicht wie CAT-1, TEMPO und TEMPOL in Phosphatpuffer gelöst, sondern zusammen mit den Lipidgrundlagen in Dichlormethan/Methanol gelöst und das Lösungsmittel abgedampft. Die entstandenen Lipid-TEMPOL-benzoat-Gemische wurden 24 Stunden gefriergetrocknet, um Lösungsmittelreste zu entfernen und anschließend mit Phosphatpuffer hydratisiert. Die Quellung der Lipide erfolgte oberhalb der Phasenübergangstemperatur der Lipidgrundlage (P80, DOPC > 20°C, DPPC > 45 °C, P80H > 80 °C) innerhalb von zwei Stunden. Danach wurden die Zubereitungen jeweils eine Minute mit dem Minishaker intensiv durchmischt, wodurch die Partikelgrößen reduziert werden sollten.

Zur Reduzierung der Lamellarität und Erhöhung der Verkapselungsraten wurden fünf Frier-Tau-Zyklen durchgeführt, indem die Probe abwechselnd in flüssigem Stickstoff eingefroren bzw. in heißem Wasser (80 °C) erhitzt wurde. Weiterhin fusionieren SUV während der Frier-Tau-Zyklen zu OLV. Dies ist wichtig bei der Herstellung von Vesikeln im Bereich von 200 nm bis 600 nm, da andernfalls sehr kleine Vesikel die Vesikelgrößenverteilungsbreite stark erhöhen [340].

Unilamellare Liposomen wurden durch Membranextrusion hergestellt (vgl. 3.1.2). In den Teflonfilterhalter des LiposoFast-Membranextruders wurden dazu zwei übereinander liegende Nucleopore-Membranfilter mit definierter Porengröße (100, 200, 400 bzw. 800 nm) eingespannt, jeweils 0,5 ml der zu verarbeitenden Dispersion in eine der beiden Glasspritzen eingesaugt und evtl. entstandene Luftblasen durch Schütteln entfernt. Beide Spritzen wurden dann mit dem Filterhalter verschraubt, der anschließend in der Halterung (LiposoFast-Stabilizer) fixiert wurde. Zur Extrusion wurden jeweils 25 Zyklen durchgeführt.

Liposomen aus Lipidgrundlagen mit hohen Phasenübergangstemperaturen (DPPC, P80H) wurden nach vorheriger Temperierung des Membranextruders im Trockenschrank bei ca. 80 °C hergestellt. Die vom Hersteller empfohlene Temperierung während der Extrusion in einem Wasserbad erwies sich aufgrund der hohen Temperaturen als nicht praktikabel.

Die extrudierten Zubereitungen wurden in Eppendorfgefäße gefüllt und bis zur Weiterverarbeitung bzw. Analyse im Kühlschrank aufbewahrt.

5.3.2 Herstellung von Liposomen mit variierendem Dipalmitoylphosphatidylglycerol-Gehalt in der Lipiddoppelmembran

Hergestellt wurden Liposomen aus den Lipidgrundlagen DOPC, DPPC, P80 und P80H mit einem molaren Anteil von 0; 2,5; 5,0; 10,0 und 20,0 % (mol/mol) PG in den Membranen nach der unter 6.3.1. beschriebenen Methode. Der Lipidgehalt der Formulierungen betrug 5 %. Jeweils 0,5 ml der nach der Hydratisierung entstandenen multilamellaren Liposomen wurden

durch zwei Membranfilter mit der Porengröße 200 nm extrudiert. Die Vermessung der Teilchen erfolgte mit der PCS und LDA. Alle Bestimmungen wurden dreifach durchgeführt.

5.3.3 Herstellung von Liposomen mit variierendem Cholesterol-Gehalt in der Lipiddoppelmembran

Es wurden Liposomen mit einem Cholesterolanteil von 0, 10, 20, 30, 40 und 50 % (mol/mol) in der Lipiddoppelmembran aus den Grundlagen DOPC, DPPC, P80 und P80H nach der unter 6.3.1 beschriebenen Methode hergestellt. Liposomen aus den Grundlagen DOPC bzw. DPPC enthielten zusätzlich 5 bzw. 10 % (mol/mol) PG. Zur Herstellung von unilamellaren Liposomen wurden multilamellare Liposomen durch einen Membranfilter mit einer Porengröße von 200 nm in 25 Zyklen extrudiert. Der Gesamtgehalt der Lipide betrug 5 %. Die Vermessung von multilamellaren bzw. unilamellaren Liposomen erfolgte mittels LS bzw. PCS und LDA. Alle Bestimmungen wurden dreifach durchgeführt.

5.3.4 Herstellung von Liposomen unter Verwendung von Membranfiltern mit variierender Porengröße

Zur Extrusion wurden Liposomenformulierungen mit den Lipidgrundlagen DOPC/CH/PG (4,5:5,0:0,5), DPPC/CH/PG (4,0:5,0:1,0), P80 bzw. P80H/CH (6:4) eingesetzt. Von diesen wurden jeweils 0,5 ml in 25 Zyklen durch einen bzw. zwei Polycarbonat-Filter mit den Porengrößen 100, 200, 400 und 800 nm extrudiert. Der Lipidgehalt der Formulierungen betrug 5, 10, 15 bzw. 20 %. Die Vermessung der extrudierten Formulierungen erfolgte mittels PCS bzw. LDA. Zusätzlich wurde der Polarisationsindex von DPH bzw. DPH-TMA nach der unter 6.2.4 beschriebenen Methode bestimmt. Alle Bestimmungen wurden dreifach durchgeführt.

5.3.5 Beladung von Liposomen mit CAT-1, TEMPO, TEMPOL und TEMPOL-benzoat

Aus den Lipidgrundlagen DOPC/CH/PG (4,5:5,0:0,5), DPPC/CH/PG (4,0:5,0:1,0), P80, P80H/CH (6:4) bzw. Presomen[®] C1 wurden Liposomen mit einem Lipidgehalt von jeweils 50 mg/ml nach der Frier-Tau-Methode hergestellt. Die Beladung der Liposomen mit CAT-1, TEMPO, TEMPOL erfolgte durch Hydratisierung der Lipidgrundlagen mit Lösungen der Spinsonden (2,5; 10,0; 20,0; 30,0 mM) in Phosphatpuffer. TEMPOL-benzoat (2,5; 5,0; 10,0; 20,0 mM) wurde zusammen mit den Lipidgrundlagen in Dichlormethan/Methanol gelöst und das Lösungsmittel abgedampft. Die entstandenen Lipid-Spinsondengemische wurden 24 Stunden gefriergetrocknet, um Lösungsmittelreste zu entfernen, und anschließend mit Phosphatpuffer hydratisiert. Die Extrusion der Formulierungen erfolgte in 25 Zyklen durch zwei Membranfilter mit der Porengröße 200 nm. Die Vermessung der Liposomen erfolgte mittels X-Band-ESR unter folgenden Bedingungen: b0-Feld: 337,5 mT ;b0-Scan: 8,0 mT, Punkte: 1024; Modulation: 0,025 mT, Mikrowellenfrequenz: 9,5 GHz. Die Verteilung der

Spinsonde zwischen der Lipidmembran und dem Dispersionsmedium wurde durch Auswertung der ESR-Spektren von Zubereitungen mit einem Spinsondengehalt von 2,5 mM mit dem Computerprogramm PEST bestimmt. Zur Bestimmung der Kurzzeitstabilität wurden die Liposomenformulierungen über 90 Tage im Kühlschrank gelagert, und am Tag nach der Herstellung sowie nach 3, 7, 14, 30 und 90 Tagen mittels PCS, LDA und X-Band-ESR vermessen. Zur Bestimmung der Stabilität der inkorporierten Nitroxylradikale wurden jeweils 50 µl in eine Glasmikropipette überführt und ebenfalls mit der X-Band-ESR vermessen. Aus den Spektren wurde die Signalintensität nach Doppelintegration bestimmt. Der am Tag nach der Herstellung bestimmte Wert diente als Bezugswert zur Berechnung der relativen Intensität. Alle Bestimmungen wurden fünffach durchgeführt.

5.3.6 Bestimmung der Beladungseffizienz von Liposomen

Zur Bestimmung der Verkapselungseffizienz von CAT-1 wurden multi- und unilamellare Liposomen mit einem Cholesterolanteil von 0, 30 und 50 % (mol/mol) in der Lipiddoppelmembran aus den Grundlagen DOPC, DPPC, P80 und P80H nach der unter 6.3.1 beschriebenen Methode hergestellt. Liposomen aus den Grundlagen DOPC bzw. DPPC enthielten zusätzlich 5 bzw. 10 % (mol/mol) PG. Jeweils 100 µl der Liposomenzubereitung (50 mg Lipid/ml, CAT-1: 20 mM) wurden mit 150 µl Phosphatpuffer versetzt. 50 µl der Dispersionen wurden in Mikropipetten überführt und anschließend im X-Band unter folgenden Bedingungen vermessen: b_0 -Feld: 337,5 mT; b_0 -Scan: 8,0 mT, Punkte: 1024; Modulation: 0,025 mT, Mikrowellenfrequenz: 9,5 GHz. Der nach Doppelintegration aus dem Spektrum bestimmte Flächeninhalt diente als Wert für den Gesamtgehalt der Probe an CAT-1. In einem zweiten Schritt sollte der nicht verkapselte Anteil von CAT-1 durch Natriumascorbat reduziert werden. Dazu wurden 100 µl der Liposomenformulierungen mit 150 µl einer isoosmolaren Natriumascorbat-Lösung in Phosphatpuffer (Na ASC 19,8g; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 1,44 g; KH_2PO_4 0,2g; Na Cl 1,75 g in 1000ml, pH 7,4) versetzt und geschüttelt. Das vorliegende Verhältnis von Natriumascorbat zur Spinsonde betrug 1:7,5. Jeweils 50 µl der entstandenen Dispersion wurden im X-Band vermessen. Aus den ESR-Signalintensitäten vor und nach der Reduktion nicht-verkapselter Anteile durch Natriumascorbat wurde die Verkapselungseffizienz berechnet.

Zur Bestimmung der Verkapselungseffizienz über die Abtrennung nicht-verkapselter Anteile durch Dialyse wurden jeweils 100 µl von ausgewählten Liposomenformulierungen mit den Lipidgrundlagen DOPC/CH/PG (6,5:0,5:3,0); DPPC/CH/PG (4,0:5,0:1,0); P80, P80H/CH (6,0:4,0) bzw. Presomen® C1 in rotierenden Dialysekammern (Biospin-Dialyser) gegen 500 ml isoosmolaren Phosphatpuffer bei 8 °C dialysiert. Aus den ESR-Signalintensitäten vor und nach der Dialyse wurde die Verkapselungseffizienz berechnet. Eine CAT-1-Lösung diente als Kontrolle. Alle Bestimmungen wurden dreifach durchgeführt.

5.3.7 Bestimmung der Freisetzung von CAT-1 aus Liposomen

Aus den Lipidgrundlagen DOPC/CH/PG, DPPC/CH/PG, P80/CH und P80H/CH mit einem Cholesterolanteil von jeweils 0, 30 bzw. 50 % wurden nach der unter 7.6 beschriebenen

Methode Liposomen-Zubereitungen (50 mg Lipid/ml) durch Hydratisierung mit einer CAT-1-Lösung (20 mM) hergestellt. Jeweils 100 µl dieser Zubereitungen wurden mit 150 µl einer isoosmolaren Natriumascorbat-Lösung in Phosphatpuffer (s. o.) versetzt und geschüttelt. Das vorliegende Verhältnis von Natriumascorbat zu Spinsonde betrug 1:7,5. Jeweils 50 µl der entstandenen Dispersion wurden in eine Glas-Mikropipette überführt und sofort im X-Band vermessen (b0-Feld: 337,5 mT; B₀-Scan: 8,0 mT, Punkte: 1024; Modulation: 0,025 mT, Mikrowellenfrequenz: 9,5 GHz.). Die Mikropipetten wurden anschließend luftdicht verschlossen und bis zu den weiteren Messungen nach 2, 4, 6, 8, 24, 48, 72, 96 Stunden im Trockenschrank bei 37 °C gelagert. Die Signalintensitäten wurden nach Doppelintegration bestimmt. Der am Tag nach der Herstellung bestimmte Wert diente als Bezugswert zur Berechnung der relativen Intensität. Alle Bestimmungen wurden dreifach durchgeführt.

5.3.8 Herstellung von Lösungen, Mikroemulsionen und Salben

Lösungen. Als Standardlösungsmittel diente ein isoosmolarer Phosphatpuffer (pH 7,4) folgender Zusammensetzung: Na₂HPO₄·2 H₂O (1,44 g/1000 ml), KH₂PO₄ (0,2g/1000 ml), NaCl (7,61g/1000 ml). Zur Herstellung von Spinsondenlösungen, die in Penetrationsuntersuchungen eingesetzt wurden, wurde der Phosphatpuffer mit Ethanol im Verhältnis 60:40 (Vol. %) gemischt. In dem Gemisch wurden CAT-1, TEMPO, TEMPOL bzw. TEMPOL-benzoat (jeweils 15 mM) gelöst.

Mikroemulsionen. Die verwendete Mikroemulsionen bestanden aus 30 % Wasser, 24,15 % Tween 80, 7,25 % Dodecanol, 7,25 % Cera perliquida und 31,36 % Propylenglykol (jeweils v/v). Die Mikroemulsionen enthielten eine Konzentration der untersuchten Spinsonden von 15 mM. TEMPOL wurde direkt in der Mikroemulsion gelöst. TEMPOL-benzoat wurde zunächst in der lipophilen Phase der Mikroemulsion gelöst und danach der wässrige Anteil hinzugefügt. Zur Herstellung einer mit CAT-1 beladenen Mikroemulsion wurde eine wässrige Lösung hergestellt und diese mit dem lipophilen Anteil der Mikroemulsion ergänzt.

Salben. Als Salbengrundlage wurde Unguentum emulsificans aquosum (Hydrophile Salbe, DAB 10) ausgewählt. Diese besteht aus 30 % emulgierendem Cetylstearylalkohol, 35 % dickflüssigem Paraffin und 35 % weißer Vaseline. Durch die Einarbeitung von 70 % (w/w) Wasser kann die Salbe in die wasserhaltige hydrophile Salbe (Unguentum emulsificans aquosum, DAB 10) überführt werden, in der sowohl lipophile als auch hydrophile Wirkstoffe gelöst werden können. Vorversuche haben gezeigt, dass die Löslichkeit von TEMPOL-benzoat in der wasserhaltigen hydrophilen Salbe nicht ausreichend war, um eine Endkonzentration von 15 mM zu erreichen. Der Wasseranteil in der Salbengrundlage wurde daraufhin um 20 % reduziert. CAT-1, TEMPO und TEMPOL wurden in Wasser gelöst und zusammen mit der Salbengrundlage in einem Eppendorfgefäß eingewogen. Das Eppendorfgefäß wurde bis zur Schmelze der Salbengrundlage auf 60 °C im Wasserbad erwärmt. Anschließend wurden die geschmolzenen Phasen mit dem Minishaker bis zur Erkaltung intensiv durchmischt. Zur Einarbeitung von TEMPOL-benzoat in die wasserhaltige hydrophile Salbe wurde die Spinsonde zunächst mit dem lipophilen Anteil der Salbe bei 60 °C aufgeschmolzen. Nach vollständiger Auflösung der Spinsondenkristalle wurde der ebenfalls auf 60 °C erwärmte Wasseranteil eingewogen und beide Phasen bis zur Erkaltung durchmischt.

5.3.9 Gewinnung und Inkubation von Humanhautproben

Auswahl des verwendeten Hautmodells. Eine der ersten zu treffenden Entscheidungen bei der Planung von Penetrations- und Permeationsstudien betrifft die Wahl des Hautmodells. Verbreitete Modelle sind exzidierte Humanhaut bzw. tierische Haut [341, 342], isolierte humane Epidermis, Zellkulturen [61] und die an Bedeutung gewinnenden dreidimensionalen Hautmodelle [343]. Diese sollen im Folgenden kurz vorgestellt werden.

Quellen für **exzidierte Humanhaut** sind kosmetische Operationen und Gewebebanken. Dabei ist die hohe biologische Variabilität der Hautproben zu beachten, die aus altersbedingten und jahreszeitlichen Unterschieden der Hautstruktur resultiert, aber auch auf die unterschiedlichen Hautregionen zurückgeführt werden kann (vgl. [344 - 346]). Daher ist eine sorgfältige Standardisierung der Untersuchungsbedingungen erforderlich. Die bei den vorliegenden Untersuchungen eingesetzte Haut stammte ausschließlich von kosmetischen Operationen. Die Verwendung von pathologisch veränderten Hautstücken konnte dabei ausgeschlossen werden. Nachteilig ist, dass die Untersuchungen an exzidierten Hautproben nur in einem begrenzten Zeitraum nach der Entnahme durchgeführt werden können. Um die Reproduzierbarkeit der Humanhautproben zu verbessern, wurde in der Regel Haut aus dem Bauchbereich, seltener aus der Brustpartie von Frauen verwendet.

Wenn Haut für *In-vitro*-Permeationsstudien eingesetzt werden soll, ist weiterhin zu beachten, dass *in vivo* die permeierenden Moleküle bereits überwiegend im Gefäßplexus der Papillarschicht resorbiert werden und nicht die Dermis durchqueren müssen. Deshalb wird für Permeations- und Penetrationsstudien häufig auch **isolierte Epidermis** eingesetzt. Diese kann mit Hilfe von Hitze [248, 347] oder Dispase [348] von der Dermis separiert werden. Beide Arten der Separation bedingen wahrscheinlich eine Änderung der Barriereigenschaften, weshalb sich eine Separierung der Epidermis mit einem Dermatom empfiehlt [349]. Bei der Durchführung von ESR-Penetrationsstudien sind diesbezügliche Überlegungen von geringer Bedeutung, da die eingesetzten Spinsonden nicht in einem Akzeptorkompartiment aufgefangen und dann quantifiziert werden müssen, sondern die Penetration in das Gewebe direkt verfolgt werden kann. In dieser Arbeit wurde hitzeseparierte Epidermis in ESR-Untersuchungen eingesetzt, bei denen aufgrund der hohen dielektrischen Intensitätsverluste an Vollhaut (vgl. 5.2.1) nur unzureichende Signalintensitäten erzielt werden konnten. Darüber hinaus wurde isolierte Epidermis zur Untersuchung der Mobilität von ESR-Spinsonden im Stratum corneum eingesetzt, wodurch eine Verteilung der Spinsonden in tiefere Hautschichten während der Versuche ausgeschlossen werden konnte.

Bei der Verwendung von **tierischer Haut** für Penetrations- und Permeationsstudien sind z.T. erhebliche Unterschiede in Bezug auf die Dicke und Beschaffenheit der Hornschicht sowie auf die Zahl und den Durchmesser der glandulären und follikulären Durchbrüche pro Flächeneinheit zur Humanhaut zu beachten. Entsprechende Unterschiede bestehen auch zwischen den verschiedenen Tierspezies [125]. *In-Vivo*-ESR-Untersuchungen wurden an Nacktmäusen durchgeführt. Im Rahmen dieser Arbeit kam tierische Haut für eine vergleichende *In-vitro*-/*In-vivo*-Untersuchung zum Einsatz, bei der die Integrität von Liposomen nach epikutaner Applikation auf HR-1-Mäuse untersucht wurde.

Eine Annäherung an physiologische Verhältnisse versucht man durch die Verwendung von **dreidimensionalen Hautäquivalenten** zu erreichen. Dabei werden Keratinozyten auf Dermis-, Kollagen- oder Kunststoffunterlagen luftexponiert kultiviert. Unter geeigneten

Bedingungen kommt es zur Ausbildung einer Hornschichtbarriere. Außerdem besteht die Möglichkeit, Interaktionen verschiedener epidermaler Zelltypen zu erfassen. Ein weiterer Vorteil besteht in der möglichen Züchtung von studienangepassten Hautmodellen [350]. So sind Systemerweiterungen um Melanozyten, Immunzellen und Endothelzellen genauso möglich, wie die Zucht definierter Hauttypen und pathologisch veränderter Systeme. Im Rahmen von Vorversuchen konnten Experimente mit einem dreidimensionalen Hautmodell durchgeführt werden. Aufgrund seiner mechanischen Instabilität und seines hohen Wassergehalts war dieses Modell für die geplanten Versuche jedoch nicht geeignet.

Präparation der Hautproben. Als optimale Methode zur Aufbewahrung frischer exzidierte Humanhaut hat sich die Lagerung in Zellzuchtplatten mit Polycarbonateinsätzen bei 4 °C erwiesen. Dazu wird das subkutane Fett der Haut mit Pinzetten und Scheren abgetrennt, anhaftendes Blut mit Phosphatpuffer entfernt und die Haut anschließend mit Zellstofftüchern trockengetupft. Aus der Haut werden mit einem Lochseisen ($d = 20 \text{ mm}$) Hautproben mit einer Fläche von $3,14 \text{ cm}^2$ ausgestanzt. Die Hautproben werden auf die Polycarbonatmembran von Nunc-Zellzuchteinsätzen ($d = 48 \text{ mm}$, Nunc®, DK) gelegt und diese in Zellzuchtplatten eingesetzt, deren sechs Kammern ($d = 50 \text{ mm}$) jeweils mit 1,5 ml Dulbeccos Modified Eagles Medium gefüllt werden. Um eine Quellung der Haut während der Lagerung zu vermeiden, wird darauf geachtet, dass die Polycarbonatmembran trocken bleibt und sich kein Überschuss an Medium auf der Oberfläche ansammelt. Der in Dulbeccos Modified Eagles Medium vorhandene pH-Indikator führt nach 12 Stunden zu einer gleichmäßigen roten Färbung der Haut, woraus auf eine ausreichende Versorgung der Haut mit Nährstoffen geschlossen werden kann. Durch die Bereitstellung von Nährstoffen und die Lagerung bei 4 °C kann die Viabilität der Haut bis zu 8 Tage nach der Entnahme gewährleistet werden. Die Umsetzung von Glucose zu Lactat im Zuge der anaeroben Glycolyse sinkt in den Hautproben innerhalb der ersten 18 h nach der Entnahme jedoch um etwa 70 % ab [351]. Eigene Untersuchungen zur Freisetzung von Lactatdehydrogenase aus abgestorbenen Zellen der Haut konnten diesen Befund bestätigen (Daten nicht abgebildet). Um reproduzierbare Bedingungen in Bezug auf die Reduktion von Spinsonden in der Haut zu schaffen, wurde auf die Durchführung von Versuchen innerhalb der ersten 18 Stunden nach der Entnahme der Hautproben verzichtet.

Aufgrund der Dimensionierung des verwendeten X-Band-Resonators und der Problematik des Auftretens dielektrischer Verluste in stark wasserhaltigen Proben besteht die Notwendigkeit der Präparation kleiner Hautproben für die ESR-Messungen in diesem Frequenzbereich.

Es wurden verschiedene Methoden der Präparation von Hautproben geprüft, wobei sich die Anwendung einer Lochzange als günstigstes Verfahren erwies. Dabei wird in der Mitte einer Hautprobe (s.o.) mit einem Stempel ($d = 10 \text{ mm}$) ein Bereich von $0,79 \text{ cm}^2$ markiert und auf diesen $15 \text{ }\mu\text{l}$ der zu untersuchenden Liposomendispersion, Mikroemulsion, Lösung bzw. 15 mg hydrophile Salbe aufgetragen. Vor der ESR-tomografischen Messung wurde der Überschuss der Zubereitung zur Vermeidung von Schmiereffekten abgetupft und danach mit Hilfe einer Lochzange ($d = 4,5 \text{ mm}$) eine Hautprobe mit einer Oberfläche von $0,16 \text{ cm}^2$ ausgestanzt.

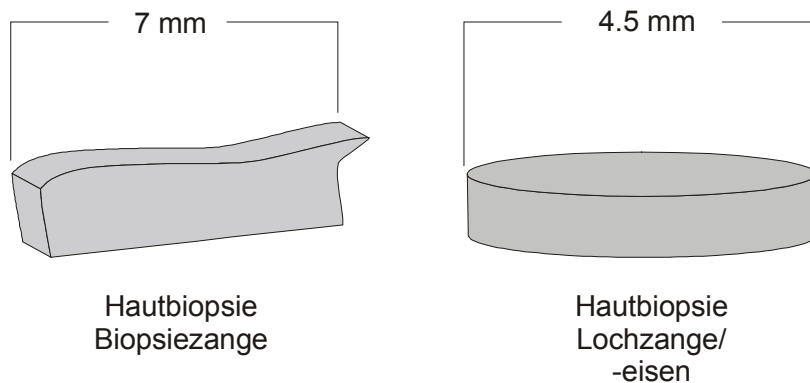


Abb. 129 Schematische Darstellung von Hautproben, die mit einer Biopsiezange oder mit einer Lochzange bzw. einem Loch Eisen ausgestanzt wurden

Der Einsatz kleiner Hautproben, die direkt mit einer Lochzange ausgestanzt und auf deren Oberfläche Liposomendispersionen aufgetragen wurden, ergab aufgrund der Spreitung der Zubereitung über den Rand der Hautprobe hinaus unbefriedigende Ergebnisse. Auch die Verwendung einer Biopsiezange erwies sich als wenig vorteilhaft, da die so gewonnenen Hautproben eine Wölbung der Oberfläche und einen kleinen stark gequetschten Bereich, der keine Einheit mit der Gesamtprobe bildete, aufwiesen (s. Abb. 129).

5.3.9.1 Bedingungen für ESR-Untersuchungen an Hautproben

Zur Durchführung von Transportstudien wurden acht Hautproben, analog der unter 7.8.1. beschriebenen Methode, auf die Polycarbonatmembran von Nunc-Zellzuchteinsätzen gelegt und diese in Zellzuchtplatten eingesetzt. Jeweils vier Kammern der Zellzuchtplatten wurden mit 1,5 ml Dulbeccos Modified Eagles Medium bzw. 1,5 ml einer Lösung von N-Ethylmaleinimide (30 mM) in Dulbeccos Modified Eagles Medium gefüllt.

Die mit Spinsonden beladenen Formulierungen wurden wie oben beschrieben epikutan appliziert. Um die Austrocknung der Hautproben während der Untersuchungen zu vermeiden, wurden diese in den Zellzuchtplatten über gesättigter Kochsalzlösung bei 32 °C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 44 % inkubiert. Die Inkubationsdauer betrug in den beschriebenen Untersuchungen maximal 24 Stunden. Jeweils eine der Hautproben wurde nach 1,0; 3,5; 7,0 bzw. 24 Stunden entnommen und mit Hilfe der ESR-Tomografie vermessen. Um die Hautproben dabei vor Wasserverlust zu schützen, wurden sie in eine modifizierte Gewebezelle überführt, die aus einem Quarzglasprobenhalter mit Abdeckung besteht. Den Austausch von Wasserdampf zwischen dem Innenraum der Gewebezelle und der Umgebung verhinderte eine Versiegelung mit Parafilm®.

5.3.9.2 Präparation von hitzeseparierter Epidermis

Zur Isolierung der Epidermis wurde Vollhaut für 1 min in heißes Wasser (60 °C) eingetaucht

und die Epidermis anschließend mit Pinzetten von der Dermis abgetrennt. Die Epidermis wurde mit der Stratum corneum-Seite nach oben auf ein Filterpapier aufgelegt, Wasserreste mit Zellstoff entfernt und die Epidermis bei 32 °C im Trockenschrank über Blaugel getrocknet. Anschließend wurde die Epidermis in Alufolie verpackt und bei –80 °C bis zu ihrem Einsatz in ESR-Untersuchungen gelagert.

5.3.10 Integrität von Liposomen nach epikutaner Applikation in Abhängigkeit von der Lamellarität und Zusammensetzung ihrer Lipidmembranen

Für die Untersuchungen wurden multi- und unilamellare Liposomen aus DOPC, DPPC und DPPG sowie 0, 30 bzw. 50 % (mol/mol) Cholesterol hergestellt. Liposomen aus DOPC bzw. DPPC enthielten zusätzlich einen PG-Anteil von 5 bzw. 10 % (mol/mol). Die Hydratisierung der Lipidgrundlagen erfolgte mit einer Lösung aus CAT-1 (20 mM) in Phosphatpuffer. Zur Herstellung von unilamellaren Liposomen wurden jeweils 0,5 ml der Formulierungen in 25 Zyklen durch einen Membranfilter mit einer Porengröße von 200 nm extrudiert. Von den zu untersuchenden Zubereitungen wurden jeweils 50 µl mit 25 µl einer isoosmolaren Natriumascorbat-Lösung in Phosphatpuffer (Na ASC 19,8g; Na₂HPO₄·2 H₂O 1,44 g; KH₂PO₄ 0,2g; Na Cl 1,75 g in 1000ml, pH 7,4) versetzt und geschüttelt. 25 µl dieser Dispersion wurden auf hitzeseparierte Epidermis (d = 10 mm) appliziert und im S-Band-ESR-Spektrometer mit einem Schleifenresonator unter folgenden Bedingungen im Abstand von 30 min vermessen: B₀-Feld: 86,334 mT; B₀-Scan: 8,06 mT, Scanzeit: 60 s; Punkte: 1024; Modulation: 0,5 mT, Verstärkung: 1000, Mikrowellenfrequenz: 2,2 GHz. Die Flächeninhalte der ESR-Signale wurden nach Doppelintegration bestimmt. Als Ausgangssignalintensität wurde der Flächeninhalt des nach 5 min aufgezeichneten Spektrums festgelegt.

5.3.11 Stabilität von Liposomen aus hydrierten Phospholipiden nach epikutaner und subkutaner Applikation

Die Herstellung von multilamellaren Liposomen aus den kommerziellen Liposomengrundlagen Presomen[®] PPG bzw. Presomen[®] C1 für diese Versuchsreihe erfolgte nach der Frier-Tau-Methode. Der Lipidgehalt betrug 100 mg/ml. Verkapselt wurden Lösungen der Spinsonde CAT-1 (138 mM) in Wasser. Nach der Durchführung der Frier-Tau-Zyklen erfolgte eine intensive Durchmischung der Probe mit einem Minishaker. Zur Abtrennung des nicht verkapselten Anteils von CAT-1 wurden 100 µl in ein Eppendorfgefäß überführt, mit 1000 µl isoosmolarem Phosphatpuffer (pH 7,4) versetzt und anschließend zentrifugiert (1 min; 3500 rpm.; 4 °C). Jeweils 1000 µl des Überstands wurden mit einer Eppendorfpipette entfernt und durch Phosphatpuffer ersetzt. Nach der dritten Zentrifugation wurden 1000 µl des Überstandes entfernt und der verbleibende Rest der Zubereitung redispersiert. Die Zubereitung wurde mittels L-Band-ESR vermessen und der Gehalt an unverkapselter Spinsonde bestimmt. Er betrug in allen Zubereitungen weniger als 2 %. Je 60,0 µl der Zubereitungen wurden epikutan mit einer Eppendorfpipette auf das untersuchte Modell, die Hautproben bzw. *in vivo* appliziert. Die subkutane Applikation der Zubereitungen erfolgte mit einer Spritze. Die applizierte Menge wurde durch das Wiegen der Spritze vor und nach der Applikation bestimmt.

Das verwendete Modell bestand aus einem Agarosegel, das durch Aufkochen von Agarose (2 %) in Wasser hergestellt wurde. Nach dem Erstarren der Mischung wurde aus dem entstandenen Gel mit einem Korkenbohrer ($d = 1,5$ cm) ein Teil herausgetrennt und in ca. 1 cm dicke Scheiben geschnitten. Die Scheiben wurden mit einem Polycarbonatfilter (Porendurchmesser von 50 μm , Nucleopore, USA) abgedeckt, auf den die Zubereitungen appliziert wurden.

Zur Entnahme von Hautproben wurden Nacktmäuse (HR-1) mit Diethylether betäubt und anschließend durch Genickbruch getötet. Die Haut vom Rücken oder vom Bauch wurde mit Scheren und Pinzetten exzidiert und mit einem Korkenbohrer ($d = 2$ cm) in runde Stücke ausgestanzt.

Für die In-Vivo-Untersuchungen wurden Nacktmäuse (HR-1) mit Diethylether betäubt. Die Erhaltung der Betäubung während des Untersuchungszeitraums erfolgte mit Halotane (Halothan Hoechst®) in einer Konzentration von 1,0 - 3,5 % (v/v). Zur Vermeidung von Positionsänderungen der Mäuse während der Experimente wurden diese auf einer Halterung mit Klebeband fixiert. Die epikutane bzw. subkutane Applikation der Zubereitungen erfolgte oberhalb des Schwanzansatzes. Als externer Standard diente DPPH. Die Registrierung von ESR-Spektren erfolgte über dem Applikationsort und über dem Herz im Wechsel von 15 min.

Alle Messungen wurden mit einem JES-RE-1L-L-Band-ESR-Spektrometer (JEOL) mit den folgenden Einstellungen ausgeführt: B_0 -Feld: 44,0 mT; B_0 -Scan: 12,0 mT; Scanzeit: 120 s; Punkte: 4900; Modulation: 0,2 mT; Verstärkung: 1000; Mikrowellenfrequenz: 1,1 GHz; Mikrowellenleistung: 2 mW

5.3.12 Mobilität von CAT-1 nach epikutaner Applikation von Liposomen

Die Untersuchungen wurden mit den unter 6.3.10 beschriebenen Liposomen durchgeführt, in denen die Spinsonde CAT-1 (20 mM) verkapselt wurde. Der Lipidgehalt betrug 5 %. Multilamellare Liposomen wurden mit 25 Zyklen durch zwei Membranfilter mit der Porengröße 200 nm extrudiert. Jeweils 25 μl der Liposomendispersion wurden auf die Stratum corneum-Seite von hitzeseparierter Epidermis ($d = 7$ mm) appliziert. Die Inkubation der Proben erfolgte im Trockenschrank bei 32 °C und 44 % rel. F. Die Proben wurden unmittelbar nach der Applikation bzw. nach 1,0; 3,5; 7,0 und 24 Stunden mit einem S-Band-ESR-Spektrometer mit einem Schleifenresonator unter folgenden Bedingungen vermessen: B_0 -Feld: 85,89 mT; B_0 -Scan: 11,96 mT; Scanzeit: 60 s; Punkte: 1024; Modulation: 0,5 mT; Verstärkung: 1000; Mikrowellenfrequenz: 2,06 GHz.

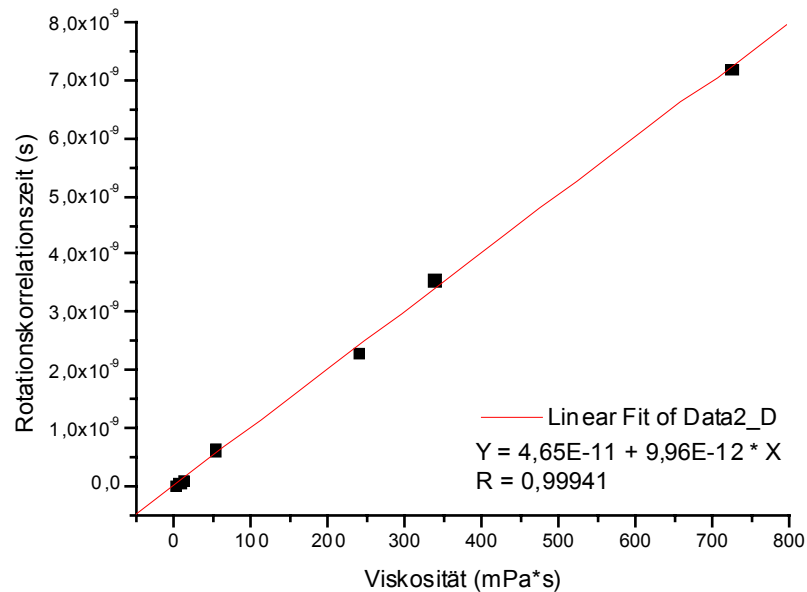


Abb. 130 Rotationskorrelationszeit von CAT-1 in Abhängigkeit von der Viskosität des Lösungsmittels (Glycerol-Wasser-Mischungen)

Zur Bestimmung der Viskosität der Mikroumgebung von CAT-1 auf dem Stratum corneum wurden zunächst Glycerol-Wasser-Mischungen hergestellt und deren Viskosität mit einem Ubbelohde-Viskosimeter bei 23 °C bestimmt. Anschließend wurde die Spinsonde (2,5 mM) in den Mischungen gelöst und diese im S-Band vermessen. Aus den mit Hilfe der empirischen Beziehung (Gleichung 1) berechneten Rotationskorrelationszeiten und der Viskosität der Glycerol-Wasser-Mischungen wurde eine Kalibriergerade erstellt (Abb. 130). Mit Hilfe der Geradengleichung konnten die aus den Parametern der registrierten ESR-Spektren berechneten Rotationskorrelationszeiten von CAT-1 auf dem Stratum corneum in die entsprechenden Viskositätswerte der Mikroumgebung von CAT-1 überführt werden.

5.3.13 Mobilität von 5-Doxylpalmitinsäure in der Membran von Liposomen vor und nach epikutaner Applikation

Die beschriebenen Versuche wurden mit den unter 6.3.3 beschriebenen Liposomen durchgeführt. In deren Membranen wurden 5 % (mol/mol) der Spinsonde 5-Doxylpalmitat inkorporiert. Der Lipidgehalt betrug 5 %. Zur Herstellung von unilamellaren Liposomen wurden multilamellare Liposomen mit 25 Zyklen durch zwei Membranfilter mit der Porengröße 200 nm extrudiert. Jeweils 50 µl der Liposomenformulierungen wurden in Mikropipetten überführt und im X-Band unter folgenden Bedingungen vermessen: B₀-Feld: 337,5 mT; B₀-Scan: 8,0 mT; Punkte:1024; Modulation: 0,3 mT; Mikrowellenfrequenz: 9,5 GHz.).

Zur Bestimmung der Mobilität von 5-Doxylpalmitinsäure in der Membran von Liposomen nach epikutaner Applikation wurden 5 µl der Liposomendispersion auf sechs Parafilm (d = 7 mm) appliziert und über gesättigter Kochsalzlösung bei 32 °C und 44 % rel. F.

inkubiert. Nach 1,0; 3,5 und 7 Stunden wurden je zwei Parafilme bei 32 °C im X-Band vermessen.

5.3.14 Mobilität von 5-Doxylpalmitat im Stratum corneum nach epikutaner Applikation von Liposomen

Zur Untersuchung von Mobilitätsänderungen der Spinsonde 5-Doxylpalmitat im Stratum corneum wurden die unter 6.3.10. beschriebenen Liposomen hergestellt. Der Lipidgehalt betrug 5 %. Zur Herstellung von unilamellaren Liposomen wurden multilamellare Liposomen mit 25 Zyklen durch zwei Membranfilter der Porengröße 200 nm extrudiert. Jeweils 5 µl der Liposomendispersion wurden auf hitzeseparierte Epidermis (d = 7 mm) appliziert und über gesättigter Kochsalzlösung bei 32 °C und 44 % rel. F. inkubiert. Nach 1,0; 3,5 und 7 Stunden wurden je zwei Stücke Epidermis nach Entfernung der Zubereitung mit Zellstoff in eine Lösung aus 5-Doxylpalmitat (20 µg/ml) in Phosphatpuffer überführt und weitere 30 min inkubiert. Danach wurde die Epidermis herausgenommen und über gesättigter Kochsalzlösung getrocknet (30 min; 32 °C; 44 % rel. F). Die Vermessung der Proben erfolgte im X-Band.

5.3.15 Abbildung von Hautschichten mit der ESR-Tomografie

Die Bauchhaut wurde nach Reinigung und Entfernung des subkutanen Fetts bei -80 °C gelagert. Vor Beginn der Versuchsreihe wurde sie bei + 4 °C über Nacht aufgetaut. Anschließend wurden mit einem Lochseisen (Ø 7 mm) uniforme Probenstücke ausgestanzt, auf die 10 µl einer Lösung aus ¹⁵N-TEMPO (5mg/ml) in bidestilliertem Wasser aufgebracht wurden. Nach der Inkubation (30 min bei 32 °C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 85 %) wurde vor jeder Messung die Sondenlösung mit Zellstoff von der Oberfläche entfernt, und aus dieser Hautprobe ein kleineres Probenstück (Ø 4.5 mm) ausgestanzt. Die Vermessung der Proben erfolgte mittels ESR-Tomografie in der unter 3.3.1. beschriebenen Weise.

5.3.16 Mobilität von Spinsonden nach epikutaner Applikation von Liposomen

Für die Untersuchungen wurden Liposomen aus den Lipidgrundlagen DOPC/CH/PG (6,5:0,5:3,0); DPPC/CH/PG (4,0:5,0:1,0); P80, P80H/CH (6,0:4,0) hergestellt und mit den Spinsonden CAT-1 (15 mM), TEMPOL (15 mM) bzw. TEMPOL-benzoat (15 mM) beladen. Jeweils 15 µl wurden wie unter 6.3.9 bzw. 6.3.9.1. auf exzidierte Humanhautproben mit und ohne Enzymhemmung epikutan appliziert. Als Referenz dienten Hautproben auf die die entsprechenden Spinsonden in Lösung bzw. Mikroemulsion (15 µl) oder hydrophiler Salbe epikutan appliziert wurden. Die Hautproben wurden 1,0; 3,5; 7,0 bzw. 24 Stunden lang inkubiert und dann mit der ESR-Tomografie vermessen. Die Auswertung der ESR-Tomogramme erfolgte nach der unter 6.2.1 beschriebenen Methode. Zur Berechnung der Viskosität der Mikroumgebung von CAT-1 bzw. TEMPOL in der Haut wurden zunächst

Glycerol-Wasser-Mischungen hergestellt und deren Viskosität mit einem Ubbelohde-Viskosimeter bei 32 °C bestimmt. Anschließend wurden die Spinsonden (2,5 mM) in den Mischungen gelöst und diese im X-Band vermessen. Aus den mit Hilfe des Computerprogramms nach Freed berechneten RBAR-Werten und der Viskosität der Glycerol-Wasser-Mischungen wurde eine Kalibrierkurve erstellt (Abb. 131). Mit Hilfe der Kalibrierfunktionen konnten die RBAR-Werte von CAT-1 bzw. TEMPOL in der Haut in die entsprechenden Viskositätswerte der Mikroumgebung überführt werden.

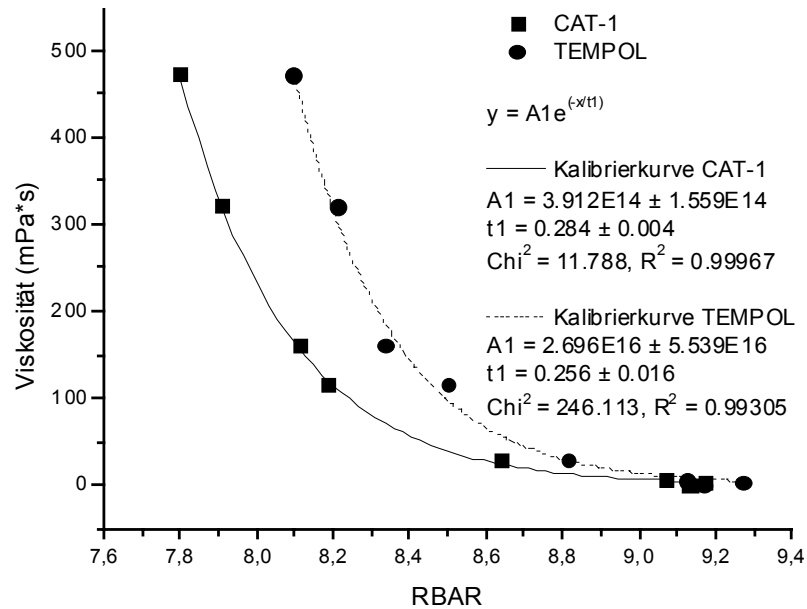


Abb. 131 Viskosität der Mikroumgebung von CAT-1 und TEMPOL in Abhängigkeit von den RBAR-Werten, die mit Hilfe des Computerprogramms nach Freed bestimmt wurden

5.4 Verwendete Geräte

Dichtebestimmung:	Paarphysica, Paarphysica (Österreich)
Eppendorfpipetten:	Eppendorf
ESR-Spektrometer (L-Band)	JES-RE-1L (JEOL, Japan) mit ES-LBIC-Resonator (JEOL, Japan)
ESR-Spektrometer (S-Band)	MT-1 (Magnettech GmbH)
ESR-Spektrometer (X-Band)	ESR 300 (ZWG Adlershof)
Fluorimeter:	Lumineszenz-Spektrometer LS 50 (Perkin-Elmer, Deutschland)
Gefriertrocknungsanlage:	Christ, Alpha 1-4, Christ Loc-1M mit Vakuumpumpe: Pfeiffer, Balzers (Deutschland)
Laserdiffraktometer	Coulter 230, Coulter electronics (UK)
Laser Doppler Anemometer	Zetasizer 4, Malver Instruments, Malvern (UK)
Membranextruder	LiposoFast Basic, AVESTIN (Canada)
Minishaker:	IKA Works, Inc., MS 1 Minishaker
Osmometer:	Knauer Osmometer Automatic, Berlin
pH-Meter:	Knick, pH-Meter 763, Multi Calimatic, Germany mit Einstabmesskette: Schott-Glaselektrode Z451
Photonenkorrelationsspektrometer	Zetasizer 4, Malver Instruments, Malvern (UK)
Rotationsverdampfer:	Rotavapor RE 111, Büchi, Schweiz; Vacuubrand, Membranvakuumpumpe, Germany
Thermomixer:	Eppendorf, Thermomixer 5437
Trockenschrank:	Heraeus Instruments, Typ B6120
Ubbelohde-Viskosimeter:	Optik: Schott AVS 350 mit Temperaturregelung: Schott CT 1450, Schott (Deutschland)
Ultrashallbad:	Bandelin, Sonorex RK 100
Wasserbad:	Shaker GFL 1083
Zentrifuge:	Eppendorf Centrifuge 5415c

6 Literatur

- 1 Mäder, K.; Swartz, H. M.; Stößer, R.; Borchert, H.-H.: The application of EPR spectroscopy in the field of pharmacy, *Pharmazie* **49**, 97 – 101 (1994)
- 2 Stößer, R.; Mäder, K.; Borchert, H.-H., Herrmann, W.; Schneider, G.; Liero, A.: Pharmaceutical aspects of ESR investigations on drug delivery systems, tissues and living systems; in: Ohya-Nishiguchi, H.; Packer, L. (Eds.): *Bioradicals detected by ESR spectroscopy*, Birkhäuser, Basel 1995, pp. 301 – 320
- 3 Mäder, K.: Pharmazeutische Anwendungen der Elektronenspinresonanzspektroskopie (ESR), *PZ Prisma* **5**, 202 – 212 (1998)
- 4 Borchert, H.-H.; Stößer, R.; Mäder, K.: ESR-Untersuchungen zu Wechselwirkungen ausgewählter Pharmaka mit physiologischen Eisenspezies, Vortrag, 1. Symposium FG Arzneimittelkontrolle der DPhG, Berlin 1991
- 5 Haberland, A.; Mäder, K.; Stößer, R.; Schimke, I.: Comparison of malondialdehyde and

- hydrogen peroxide modified Cu Zn SOD by EPR spectroscopy, *Agents Actions* **40**, 166 – 170 (1993)
- 6 Mäder, K.: Anwendungen der Elektronenspinresonanzspektroskopie und –tomographie in der Biopharmazie, Dissertation, HU Berlin 1993
 - 7 Stößer, R.; Mäder, K.; Henke, W.; Richter, N.; Borchert, H.-H.: Peculiarities of nitroxide radicals in biological systems – EPR studies on mitochondria, fungi and living mice, Int. conference on critical aspects of free radicals in chemistry, biochemistry and medicine, Wien 1993, Proc. 44
 - 8 Henke, W.; Mäder, K.; Nickel, E.; Stößer, R.: Effects of nitroxide spin labels on respiration of renal cortical mitochondria, *ibid.* Proc. 100
 - 9 Stößer, R.; Mäder, K.; Borchert, H.-H.: Monitoring metabolic processes in biological systems using rapid freezing ESR at $T \geq 4$ K, Workshop on in vivo EPR and EPR studies of viable biological systems, Dartmouth Medical School, Hanover NH, USA 1993
 - 10 Wiesner, R.; Rathmann, J.; Holzhütter, H. G.; Stößer, R.; Mäder, K.; Nolting, N.; Kuhn, H.: Nitric oxide oxidises a ferrous mammalian lipoxygenase to a preactivated species, *FEBS Letters* **389**, 229 – 232 (1996)
 - 11 Mäder, K.; Kroll, C.; Stößer, R.; Henke, W.; Borchert, H.-H.: Purification and characterization of spin adducts by TLC- and HPTLC-techniques, 4th Int. Symposium on spin trapping and organic EPR spectroscopy with applications in chemistry, biology and medicine, Oklahoma City OK, USA 1993
 - 12 Stößer, R.; Herrmann, W.; Mäder, K.; Borchert, H.-H.: On the reaction of spin traps with outer and inner surfaces of doped oxides and aluminosilicates, *ibid.*
 - 13 Mäder, K.; Basic, G.; Swartz, H. M.: In vivo detection of anthralin derived free radicals in the skin of hairless mice by low frequency electron paramagnetic resonance spectroscopy, *J. Invest. Dermatol.* **104**, 514 – 517 (1995)
 - 14 Mäder, K.; Stößer, R.; Borchert, H.-H.: Direkter Nachweis freier Radikale an der lebenden Maus durch Elektronenspinresonanz, *Pharm UZ* **20**, 124 (1992)
 - 15 Mäder, K.; Stößer, R.; Borchert, H.-H.: Spin probe pharmacokinetics studied on living mice with X-band ESR, 6th Int. Symposium on Organic Free Radicals, Noordwijkerhout, Niederlande 1992, Proc. 110 – 113
 - 16 Mäder, K.; Stößer, R.; Borchert, H.-H.: Transcutaneous absorption of nitoxide radicals detected in vivo by means of X-band ESR, *Pharmazie* **47**, 946 – 947 (1992)
 - 17 Mäder, K.; Stößer, R.; Borchert, H.-H.: Detection of free radicals in living mice after inhalation of DTBN by X-band ESR, *Free Radical Biol. Med.* **14**, 339 – 342 (1993)
 - 18 Mäder, K.; Stößer, R.; Kroll, C.; Borchert, H.-H.: Detektion metabolischer Prozesse durch rapid freezing ESR ≥ 4 Kelvin, *Pharm UZ* **23**, 243 – 244 (1994)
 - 19 Mäder, K.; Stößer, R.; Henke, W.; Borchert, H.-H.: On the metabolism of nitroxide radicals, Workshop on in vivo EPR and EPR studies of viable biological systems, Dartmouth Medical School, Hanover NH, USA 1993
 - 20 Mäder, K.; Swartz, H. M.; Stößer, R.; Borchert, H.-H.: Noninvasive in vivo studies of pharmacokinetic and metabolic parameters using EPR spectroscopy, *Eur. J. Pharm. Sci.* **2**, 105 (1994)

- 21 Borchert, H.-H.; Mäder, K.; Stößer, R.; Kroll, C.: Free radical intermediates in fungal metabolism as a model of mammalian drug metabolism, *Magnetic Resonance in Medicine (Japan)* **6**, 375 – 377 (1995)
- 22 Kroll, C.; Mäder, K.; Borchert, H.-H.: Untersuchungen zur Biotransformation von Piperidin-Nitroxylradikalen, *Pharm UZ* **25**, 142 (1996)
- 23 Mäder, K.; Gallez, B.; Swartz, H. M.: In vivo EPR: An effective new tool for studying pathophysiology and pharmacology, *Appl. Radiat. Isotopes* **47**, 1663 – 1667 (1996)
- 24 Kroll, C.; Witte, P.; Borchert, H.-H.: Untersuchungen zu Einsatzmöglichkeiten der Festphasenmikroextraktion (SPME) bei der Probenvorbereitung aus einer komplexen biologischen Matrix, *Pharm UZ* **27**, 33 (1997)
- 25 Kroll, C.; Borchert, H.-H.: Metabolism of nitroxide spin probes with piperidine structure in a human keratinocyte cell line, *Proc. 2nd Int. Conf. on Bioradicals*, Yamagata (Japan) 1997
- 26 Osterloh, K.; Kroll, C.; Mäder, K.; Borchert, H.-H.; Sammler, B.; Kirmse, C.: HPLC und Elektronenspinresonanz-Spektroskopie on-line gekoppelt, *GIT Labor-Fachzshr.* **42**, 24 – 25 (1998)
- 27 Kroll, C.: Analytik, Stabilität und Biotransformation von Spinsonden sowie deren Einsatz im Rahmen pharmazeutisch-technologischer und biopharmazeutischer Untersuchungen, Dissertation, HU Berlin 1999
- 28 Sintzel, M. B.; Schwach-Abdellaoui, K.; Mäder, K.; Stößer, R.; Heller, J.; Tabatabay, C.; Gurny, R.: Influence of irradiation sterilization on semi-solid poly (ortho ester), *Int. J. Pharm.* **175**, 165 – 176 (1998)
- 29 Mäder, K.; Domb, A.; Swartz, H. M.: Gamma sterilization induced radicals in biodegradable drug delivery systems, *Appl. Rad. Isot.* **47**, 1669 – 1674 (1996)
- 30 Mäder, K.: Untersuchungen zur Arzneistofffreisetzung aus biologisch abbaubaren Arzneiträgern in vitro und in vivo, Habilitationsschrift, HU Berlin 1997
- 31 Bittner, B.; Mäder, K.; Kroll, C.; Borchert, H.-H.; Kissel, T.: Tetracycline loaded poly (DL-lactide-co-glycolide) micropheres prepared by a spray drying technique. Influence of γ -irradiation on radical formation and polymer degradation, *J. Contr. Rel.* **59**, 23 – 32 (1999)
- 32 Mäder, K.; Stößer, R.; Borchert, H.-H.; Mank, R.; Nerlich, B.: ESR-Untersuchungen zur Wasserpenetration in Polymerfolien und Mikropartikel auf der Basis von biologisch abbaubaren Polyestern, *Pharmazie* **46**, 342 – 345 (1991)
- 33 Mäder, K.; Borchert, H.-H.; Stößer, R.; Groth, N.; Herrling, T.: Modelluntersuchungen zur Lokalisation und Mobilität von Arzneistoffen in Polymerfolien mit Hilfe der ESR-Tomographie, *Pharmazie* **46**, 439 – 442 (1991)
- 34 Mäder, K.; Borchert, H.-H.; Stößer, R.: Charakterisierung des Verhaltens von Spinsonden in Arzneiträgersystemen mit Hilfe der ESR-Spektroskopie und -Tomographie, *Pharm UZ* **20**, 127 (1991)
- 35 Mäder, K.; Borchert, H.-H.; Stößer, R.; Lüders, F.: Dynamic and structure of microemulsions studied by EPR and other methods, *Pharm. Weekbl.* **14**, Suppl. F, 23 (1992)
- 36 Borchert, H.-H.; Mäder, K.; Stößer, R.: Characterization of primary liberation processes in biodegradable polymers by EPR-spectroscopy and EPR-imaging, *Pharm. Weekbl.* **14**, Suppl. F, 23 (1992)

- 37 Mäder, K.; Stöber, R.; Borchert, H.-H.: EPR-spectroscopy and EPR-imaging applied on microemulsions, biodegradable polyesters and on living mice, 6th Int. Symp. on Magnetic Resonance in Colloid and Interface Science, Florenz 1992
- 38 Mäder, K.; Stöber, R.; Lüders, F.; Borchert, H.-H.: ESR-Untersuchungen zur Charakterisierung von Mikrokompartmentierungen in Arzneiträgersystemen, *Pharm UZ* **22**, 150 (1993)
- 39 Stöber, R.; Mäder, K.; Borchert, H.-H.; Lueck, R.: High pressure treatment of pharmaceutical drug delivery and related systems, *High Press. Res.* **13**, 29 – 33 (1994)
- 40 Kroll, C.; Mäder, K.; Stöber, R.; Borchert, H.-H.: pH-Wertbestimmungen in W/O-Emulsionen und biologisch abbaubaren Polymeren mittels Elektronenspinresonanz – (ESR) Spektroskopie, *Pharm UZ* **23**, 230 – 231 (1994)
- 41 Kroll, C.; Mäder, K.; Stöber, R.; Borchert, H.-H.: Direct and nondestructive measurement of proton activity inside nontransparent W/O-systems and biodegradable polymers by means of electron paramagnetic resonance spectroscopy, *Eur. J. Pharm. Sci.* **2**, 157 (1994)
- 42 Stöber, R.; Mäder, K.; Borchert, H.-H.; Herrmann, W.; Schneider, G.; Liero, A.: In vitro and in vivo ESR in S- and X-band to monitor biopharmaceutical processes in mammalian skin, *Magnetic Resonance in Medicine (Japan)* **6**, 349 – 351 (1995)
- 43 Kroll, C.; Mäder, K.; Stöber, R.; Borchert, H.-H.: Direct and continuous determination of pH values in nontransparent W/O systems by means of EPR spectroscopy, *Eur. J. Pharm. Sci.* **3**, 21 – 26 (1995)
- 44 Mäder, K.; Nitschke, S.; Domb, A.; Elmalak, O.; Stöber, R.: Localized measurement of microviscosity and pH-values inside biodegradable polymers by spectral spatial EPR imaging, 3rd Jerusalem Conf. on Pharmaceutical Sciences and clinical Pharmacology, Proc. p. 23, Jerusalem 1996
- 45 Mäder, K.; Gallez, B.; Liu, K. J.; Swartz, H. M.: Noninvasive in vivo characterization of release processes in biodegradable polymers by low frequency electron paramagnetic resonance spectroscopy, *Biomaterials* **17**, 459 – 463 (1996)
- 46 Mäder, K.; Nitschke, S.; Stöber, R.; Borchert, H.-H.; Domb, A.: Nondestructive and localised assesment of acidic microenvironments inside biodegradable polyanhydrides by spectral spatial electron paramagnetic resonance imaging, *Polymer* **38**, 4785 – 4794 (1997)
- 47 Mäder, K.; Basic, G.; Domb, A.; Elmalak, O.; Langer, R.; Swartz, H. M.: Noninvasive in vivo monitoring of drug release and polymer erosion from biodegradable polymers by EPR spectroscopy and NMR imaging, *J. Pharm. Sci.* **86**, 126 – 134 (1997)
- 48 Mäder, K.; Nitschke, S.; Stöber, R.; Borchert, H.-H.; Domb, A.: Mapping of pH-gradients, microviscosity and free radical concentrations in drug delivery systems by spectral-spatial-EPRI, 2nd Int. Conf. on Bioradicals and 5th Int. Workshop on EPR Imaging and in-vivo-EPR Spectroscopy, Yamagata (Japan) 1997
- 49 Freed, J. H.: Theory of Slow Tumbling ESR Spectra for Nitroxides in Berliner, L. J.: Spin Labeling, Theory and Applications, Academic Press, New York (1976)
- 50 Korting, H. C.; Stolz, W.; Schmid, M. H.; Maierhofer, G.: Interaction of liposomes with human epidermis reconstructed in vitro, *Br. J. Dermatol.* **132**, 571 – 579 (1995)
- 51 Fresta, M.; Puglisi, G.: Application of liposomes as potential cutaneous drug delivery systems. In vitro and in vivo investigation with radioactively labelled vesicles, *J. Drug. Target.* **4**, 95 – 101 (1996)

- 52 Lasch, J.; Deicher, J.; Schubert, R.: Do liposomes as drug penetration enhancers penetrate intact into human skin ?, in Pleyer, U.; Schmidt, K. H. (Eds.): *Liposomes in Ophtalmology and Dermatology*, Thiele, Stuttgart, 1993
- 53 Röding, J.: Natipide II: New easy liposomes system, *SÖFW* **14**, 509 - 512 (1990)
- 54 Egbaria, K.; Weiner, N.: Topical application of liposomal preparations, *Cosmet. & Toilet.* **106**, 79 - 93 (1991)
- 55 Jocham, U. E.: Liposomen in Dermatika, *PZ* **24**, 32 - 33 (1989)
- 56 Mantripragada, S.: A lipid based depot (DepoFoam® technology) for sustained release drug delivery, *Progress Lipid Res.* Article in Press (2002)
- 57 Ramprasad, M. P.; Anatharamaiah, G. M.; Garber, D. W.; Katre, N. V.: Sustained-delivery of an apolipoproteinE-peptidomimetic using multivesicular liposomes lowers serum cholesterol levels, *J. Control. Rel.* **79**, 207 – 218 (2002)
- 58 Katre, N. V.; Asherman, J.; Schaefer, H.; Hora, M.: Multivesicular Liposome (DepoFoam) Technology for the Sustained Delivery of Insulin-like Groth Faktor-I (IGF-I), *J. Pharm. Sci.* **87**, 1341 – 1345 (1998)
- 59 Homepage SkyePharma, [www. Skyepharma.com](http://www.Skyepharma.com), 2002
- 60 Michel, C.; Purmann, T.; Mentrup, E.; Seiller, E.; Kreuter, J.: Effect of liposomes on percutaneous penetration of lipophilic materials, *Int. J. Pharm.* **84**, 93 – 105 (1992)
- 61 Zellmer, S.; Reissig, D.; Lasch, J.: Reconstructed human skin as model for liposome–skin interaction, *J. Control. Rel.* **55**, 271 – 279 (1998)
- 62 Ogiso, T.; Ogiso, H.; Paku, T.; Iwaki, M.: Phase transition of rat stratum corneum lipids by an electron paramagnetic resonance study and relationship of phase states to drug penetration, *Biochim. Biophys. Acta* **1301**, 97 – 104 (1996)
- 63 Merk, H. F.; Bickers, D. R.: *Dermatopharmakologie und Dermatotherapie*, Springer, Berlin 1992
- 64 Bos, J. D.; Kapsenberg, M. L.: The skin immune system: progress in cutaneous biology, *Immunol. Today* **14**, 75 (1993)
- 65 Barker, J. N.; Mitra, R. S.; Griffith, C. E. M.; Dixit, V. M.; Nickoloff, B. J.: Kreatinozytes as initiators of inflammation, *Lancet* **337**, 211- 214 (1991)
- 66 Bos, J. D.; Kapsenberg, M. L.: Lymphocyte subpopulation of the skin immune system; in: Bos, J. D. (Ed.): *Skin immune system*, CRC Press Inc. Boca Raton 1990, 89 - 108
- 67 Hotchkiss, S. A. M.: Skin as a xenobiotic metabolizing organ, *Progr. Drug Met.* **13**, 217 (1992)
- 68 Elias, P. M.: Lipids and the epidermal permeability barrier, *Arch. Dermatol. Res.* **270**, 95 – 118 (1981)
- 69 Elias, P. M.: Epidermal lipids, barrier function and desquamation, *J. Invest. Dermatol.* **80**, 44 – 49 (1983)
- 70 Elias, P. M.: Plastic wrap revisited. The Stratum corneum two compartment model and its clinical implications, *Arch. Dermatol.* **123**, 1405 – 1406 (1987)
- 71 Elias, P. M.: Structure and function of the stratum corneum permeability barrier, *Drug Dev.*

- Res. **13**, 97 – 105 (1988)
- 72 Odland, G. P.; Holbrook, K.: The lamellar granules of epidermis, *Curr. Probl. Dermatol.* **9**, 29 – 49 (1987)
- 73 Yardley, H. J.; Summerly, R.: Lipid composition and metabolism in normal and diseased epidermis, *Pharmacol. Ther.* **13**, 357 – 374 (1981)
- 74 Long, S.; Wertz, P. W.; Strauss, J. S.: Human stratum corneum polar lipids and desquamation, *Arch. Dermatol. Res.* **277**, 284 – 287 (1985)
- 75 Landmann, L.: The epidermal permeability barrier, *Anat. Embryol.* **178**, 1 – 13 (1988)
- 76 Wertz, P. W.; Downing, D. T.: Stratum corneum: Biological and biochemical considerations, in: Hadgraft, J.; Guy, R. H. (Eds.), *Transdermal drug delivery: developmental issue and research initiatives*, pp. 1 – 22, Marcel Dekker Inc., New York 1989
- 77 Wertz, P. W.; Mietke, M. C.; Long, S. A.; Strauss, J. S.; Downing, D. T.: The composition of the ceramides from human stratum corneum and from comedones, *J. Invest. Dermatol.* **84**, 410 – 412 (1985)
- 78 Robson, K. J.; Stewart, M. E.; Michelsen, S.; Lazo, N. D.; Downing, D. T.: 6-hydroxy-4-sphinganine in human epidermal ceramides, *J. Lipid Res.* **35**, 2060 – 2068 (1994)
- 79 Motta, S.; Marcello, M.; Sesana, S.; Ruggero, C.; Carelli, S.; Ghidoni, R.: Ceramide composition of the psoriatic scale, *Biochem. Biophys. Acta* **1182**, 141 – 151 (1993)
- 80 Barry, B. W.: Mode of action of penetration enhancers in human skin, *J. Controll. Rel.* **6**, 85 – 97 (1987)
- 81 Jung, L.; Pelzer, J.: Effects of moisturizing agents: in vivo measurements, in: Frost, P.; Horwitz, S. N. (Eds.): *Principles of cosmetics for the dermatologists*, pp. 41 – 44, Mosby Comp. St. Louis, Toronto, London 1982
- 82 Howes, D.; Guy, R. H.; Hadgraft, J.; Heylings, J.; Hoeck, U.; Kemper, F.; Maibach, H. J.; Marty, J.-P.; Parra, J.; Rekkas, D.; Rodelli, I.; Schaefer, H.; Täuber, U.; Verbieke, N.: Methods for assessing percutaneous absorption, *ATLA* **24**, 81 (1996)
- 83 Guy, R.H.; Hadgraft, J.: Structure – activity correlations in percutaneous absorption, in: Bronaugh, R. L.; Maibach, H. I. (Eds.): *Percutaneous absorption*, Marcel Dekker, New York 1989
- 84 Barry, B. W.: Skin transport in: Barry, B. W. (Ed.): *Dermatological formulations*, Marcel Dekker, New York 1983
- 85 Wepierre, J.; Doucet, O.; Marty, J. P.: Percutaneous absorption of drugs in vitro: role of transepidermal and transfollicular routes in: Scott, R. C.; Guy, R. H.; Hadgraft, J. (Eds.), *Prediction of percutaneous penetration*, p. 129, IBC Techn. Serv. Ltd., London 1990
- 86 Bidmon, H.-J.; Pitts, J. D.; Solomon, H. F.; Bondi, J. V.; Stumpf, W. E.: Estradiol distribution and penetration in rat skin after topical application, studied by high resolution autoradiography, *Histochem.* **95**, 43 (1990)
- 87 Hueber, F.; Schaefer, H.; Wepierre, J.: Role of transepidermal and transfollicular routes in percutaneous absorption of steroids: In vitro studies on human skin, *Skin Pharmacol.* **7**, 237 (1994)
- 88 Albery, W. J.; Hadgraft, J.: Percutaneous absorption: In vivo experiments, *J. Pharm. Pharmacol.* **31**, 140 (1979)

- 89 Tur, E.; Maibach, H. J.; Guy, R. H.: Percutaneous penetration of methyl nicotinate at three anatomic sites: Evidence for an appendageal contribution to transport? *Skin Pharmacol.* **4**, 230 (1991)
- 90 Täuber, U.: Drug metabolism in the skin: Advantages and disadvantages in: Hadgraft, J.; Guy, R. H. (Eds.) *Transdermal drug delivery*, p. 99, Marcel Dekker, New York 1989
- 91 Liu, M.; Higuchi, W. I.; Ghanem, A. H.; Good, W. R.: Transport of β -estradiol in freshly excised human skin in vitro: Diffusion and metabolism in each skin layer, *Pharm. Res.* **11**, 1777 (1994)
- 92 Ziegenmeyer, J.: Haut – Vehikel – Pharmakon, die entscheidenden Kriterien für die perkutane Absorption, *Pharm UZ* **15**, 129 – 143 (1986)
- 93 Wertz, P. W.; Swartzendruber, D. C.; Abraham, W.; Madison, K. C.; Downing, D. T.: Essential fatty acids and epidermal integrity, *Arch. Dermatol.* **123**, 1381 – 1384 (1987)
- 94 Imokawa, G.; Akasaki, S.; Hattori, M.; Yoshizuka, N.: Selective recovery of deranged water-holding properties by stratum corneum lipids, *J. Invest. Dermatol.* **87**, 758 – 761 (1986)
- 95 Alza Corporation, USA: Electrotransport a technology whose time come, Data sheet (1993)
- 96 Prausnitz, M. R.; Pliquett, U.; Langer, R.; Weaver, J. C.: Rapid temporal control of transdermal drug delivery by electroporation, *Pharm. Res.* **11**, 1834 – 1837 (1994)
- 97 Prausnitz, M. R.: The effects of electric current applied to skin. A review for transdermal drug delivery, *Adv. Drug Delivery Rev.* **18**, 395 – 425 (1996)
- 98 Inamori, T.; Ghanem, A.-H.; Higuchi, W. I.; Srinivasan, V.: Macromolecule transport in and effective pore size of ethanol pretreated human epidermal membrane, *Int. J. Pharm.* **105**, 113 – 123 (1994)
- 99 Meldan, V. M.; Walmsley, A. D.; Irwin, W. J.: Phonophoresis – Is it a reality? *Int. J. Pharm.* **118**, 129 – 149 (1995)
- 100 Simonin, J. P.: On the mechanism of in vitro and in vivo phonophoresis, *J. Control. Release* **33**, 125 – 141 (1995)
- 101 Lipkovker, L. M.: Ultrasonic transdermal drug delivery system. *Endodermic Medical Tech. Comp.*, USA World: PCT/US 93/09798 (WO 94/08655), 1994
- 102 Hotchkiss, S. A. M.: Skin as a xenobiotic metabolizing organ, *Progr. Drug Met.* **13**, 217 (1992)
- 103 Merk, H. F.; Jugert, F. K.: Metabolic activation of drugs and xenobiotica by the skin, in: Gurny, R.; Teubner, A. (Eds.): *Dermal and transdermal drug delivery*, Wiss. Verlagsges. Stuttgart 1993
- 104 Steinsträsser, J.; Merkle, H. P.: Dermal metabolism of topically applied drugs: Pathways and models reconsidered, *Pharm. Acta Helv.* **70**, 3 (1995)
- 105 Brandt, O.: Vergleichende pharmakokinetische Untersuchungen zur perkutanen Resorption und zum Hautmetabolismus von Steroiden und steroidähnlichen Substanzen, Dissertation, Humboldt-Universität zu Berlin 1996
- 106 Täuber, U.: Drug metabolism in the skin: Advances and Disadvances, in: Hadgraft, J.; Guy, R. H. (Eds.): *Transdermal drug delivery – developmental issues and research initiatives*, Marcel Dekker Inc., New York 1989

- 107 Stephanek, K.; Levy, J. J.: A noninvasive method for quantification of human neutrophil elastase activity and elastase-inhibiting activity in psoriatic and healthy skin extracts, *J. Eur. Acad. Dermatol. Venerol.* **5**, 104 (1996)
- 108 Schallreuter, K. U.; Pittelkow, M. R.; Gleason, F. K.; Wood, J. M.: The role of calcium in the regulation of free radical reduction by thioredoxin reductase at the surface of the skin, *J. Inorg. Chem.* **28**, 227 – 236 (1986)
- 109 Schallreuter, K. U.; Pittelkow, M. R.; Wood, J. M.: Free radical reduction by thioredoxin reductase at the surface of a normal and vitiliginous human keratinocytes, *J. Invest. dermatol.* **87**, 728 – 732 (1987)
- 110 Fuchs, J.: Free radical reduction by thioredoxin reductase, *J. Invest. Dermatol.* **91**, 92 – 93 (1988)
- 111 Fuchs, J.; Freisleben, H. J.; Podda, M.; Zimmer, G.; Milbradt, R.; Packer, L.: Nitroxide radical biostability in skin, *Free Rad. Biol. Med.* **15**, 415 – 423 (1993)
- 112 Osborne, D.W.; Henke, J.J.: Skin penetration enhancers cited in the technical literature, <http://www.pharmatech.com/technical/osborne/osborne.htm>, 29.09.2000
- 113 Williams, A. C.; Barry, B. W.: Skin absorption enhancers, *CRC* **9**, 305 – 353 (1992)
- 114 Walters, K. A.; Hadgraft, J. (Eds.): *Pharmaceutical skin penetration enhancement*, Marcel Dekker, New York 1993
- 115 Barry, B. W.: Skin penetration enhancers – The chemical approach, in: Gurny, R.; Teubner, A. (Eds.): *Dermal and transdermal drug delivery*, Wiss. Verlagsges. Stuttgart 1993
- 116 Ghosh, T. K.; Banga, A. K.: Methods of enhancement of transdermal drug delivery. IIA. Chemical permeation enhancers, *Pharm. Technol. Eur.* **5**, 62 – 86 (1993)
- 117 Hsieh, D.S. (Ed.): *Drug permeation enhancement: Theory and applications*, Marcel Dekker, New York 1994
- 118 Walker, R.B.; Smith, E.W.: The role of percutaneous penetration enhancers, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **18**, 295-301 (1996)
- 119 Smith, E.W.; Maibach, H.: *Percutaneous penetration enhancers*, CRC Press, Boca Raton 1995
- 120 Ghyczy, M.: Die Hautstruktur und adäquate Kosmetika. Beeinflussung der Permeabilitätsbarriere der Haut mittels Struktur der Kosmetika, *Kosmet. Med.* **20**, 192-195 (1999)
- 121 Tsai, J.C.; Feingold, K.R.; Crumrine, D.; Wood, L.C.; Grunfeld, C.; Elias, P.M.: Permeability barrier disruption alters the localization and expression of TNF alpha/protein in the pidermis, *Arch. Dermatol. Res.* **286**, 242-248 (1994)
- 122 Fartasch, M.: Ultrastructure of the epidermal barrier after irritation, *Microsc. Res. Tech.* **37**, 193-199 (1997)
- 123 Wood, L.C.; Jackson, S.M.; Elias, P.M.; Grunfeld, C.; Feingold, K.R.: Cutaneous barrier perturbation stimulates cytokine production in the epidermis of mice, *J. Clin. Invest.* **90**, 482-487 (1992)
- 124 De La Maza, A.; Lopez, O.; Coderch, L.; Parra, J.: Permeability changes in liposomes modelling the stratum corneum lipid composition due to C12-alkyl betaine/sodium dodecyl sulfate mixtures, *Int. J. Pharm.* **171**, 63-74 (1998)
- 125 Niedner, R.; Ziegenmeyer, J. (Eds.): *Dermatika. Therapeutischer Einsatz, Pharmakologie und Pharmazie*, Wiss. Verlagsges. Stuttgart 1992

- 126 Lippold, B.: Wirkungsbeeinflussung bei Lösungssalben durch Vehikel am Beispiel von Methylnicotinat; *Acta Pharm. Techno* **35**, 136-142 (1989)
- 127 Schauder, S.; Ippen, H.: Lichtschutzfilterhaltige Präparate in der Bundesrepublik Deutschland, *Z. Hautkr., Suppl* 1 (1988)
- 128 Schauder, S.; Ippen, H.: Photosensitivität, in: Fuchs, E.; Schulz, K.H. (Eds.): *Manuale allergicum*, Dustri Verlag Dr. K. Feistle, Deisenhofen 1988
- 129 Van Abbe, N.J.: The substantivity of cosmetic ingredients to the skin, hair and teeth, *J. Soc. Cosmet. Chem.* **25**, 23 (1974)
- 130 Goddard, E.D.: Substantivity through cationic substitution, *Cosmet. Toilett.* **102**, 71 (1987)
- 131 Blank, I.H.: Observations on the mechanisms of the protective action of sunscreens, *J. Invest. Dermatol.* **78**, 381 (1982)
- 132 Katz, S.J.: Relative effectiveness of selected sunscreens, *Arch. Dermatol.* **102**, 466 (1970)
- 133 Lorenzetti, O.J.: The influence of protein vehicles on the permeability of sunscreens, *J. Soc. Cosmet. Chem.* **28**, 593 (1975)
- 134 Ansdmi, C.: Substantive sunscreens: The state of the art today, *Chimicaoggi* **8**, 53 (1990)
- 135 Monti, D.: Substantivity of sunscreens – in vitro evaluation of the transdermal permeation characteristics of some benzophenone derivatives, *Int. J. Cosmet. Sci.* **15**, 45 (1993)
- 136 Hagedorn-Leweke, U.; Lippold, B.C.: Zur Penetration von UV-Filtern und anderen Substanzen, *Pharm. Ztg.* **143**, Suppl. Nr. 2, 6-11 (1998)
- 137 Charlet, E.; Finkel, P.: Gesetzmäßigkeiten zum Einsatz von Lichtschutzsubstanzen in Emulsionsgrundlagen, *Ärzt. Kosmetol.* **7**, 169 (1977)
- 138 Charlet, E.; Finkel, P.: Neue Aspekte für die Entwicklung von Lichtschutzmitteln, *Ärzt. Kosmetol.* **9**, 368 (1979)
- 139 Ippen, H.; Perschmann, U.: Untersuchungen zur Lichtphysiologie der Haut. III. Zum Verhalten fluoreszierender Lichtschutzmittel auf der Haut, *Arch. Klein. Exp. Dermatol.* **236**, 207 (1970)
- 140 Müller, B.W.: Mikroemulsionen als neue Wirkstoff-Trägersysteme, in: Müller, R.H.; Hildebrand, G.E. (Eds.): *Pharmazeutische Technologie: Moderne Arzneiformen*, Wiss. Verlagsges. Stuttgart 1998
- 141 Junginger, H.E.: Systematik der Dermatika – Kolloidchemischer Aufbau, in: Niedner, R.; Ziegenmeyer, J. (Eds.): *Dermatika. Therapeutischer Einsatz, Pharmakologie und Pharmazie*, Wiss. Verlagsges. Stuttgart 1992
- 142 Benita, S.; Levy, M.Y.: Submicron emulsions as colloid drug carriers for intravenous administration: comprehensive physicochemical characterization, *J. Pharm Sci.* **82**, 1069-1079 (1993)
- 143 Lucks, J.S.; Müller, B.W.: Parenterale Fetteulsionen – Struktur, Stabilität, Verwendung und In-vivo-Schicksal, *Krankenhauspharmazie* **15**, 51-57 (1994)
- 144 Schmitt, J.; Braun, B.: Parenterale Fetteulsionen als Arzneistoffträger, in: Müller, R.H.; Hildebrand, G.E. (Eds.): *Pharmazeutische Technologie: Moderne Arzneiformen*, Wiss. Verlagsges. Stuttgart 1998
- 145 Gareiß, J.; Hoff, E.; Ghyczy, M.: Phospholipide – Liposomen – Nanoemulsionen, *Parfümerie*

- und Kosmetik **10**, 652-659 (1994)
- 146 Dunn, V.: The ultrastructure of chylomicra and of the particles in an artificial fat emulsion; Proc. Roy. Soc. B. **169**, 147-152 (1968)
- 147 Daniels, R.: Moderne Grundlagen und Wirksamkeit, Pharm. Ztg. **143**, Suppl. 35, 3-8 (1998)
- 148 Daniels, R.: Polymerstabilisierte Submikron-Emulsionen als Arzneiträgersysteme, in: Müller, R.H.; Hildebrand, G.E. (Eds.): Pharmazeutische Technologie: Moderne Arzneiformen, Wiss. Verlagsges. Stuttgart 1998
- 149 Schulz, M.: Entwicklung tensidfreier Submikron-Emulsionen mit MHPC als Polymeremulgator, Dissertation Universität Regensburg 1996
- 150 Müller, R.H.: Feste Lipidnanopartikel, in: Müller, R.H., Hildebrand, G.E. (Eds.): Pharmazeutische Technologie: Moderne Arzneiformen, Wiss. Verlagsges. Stuttgart 1998
- 151 Kutz, G.: Galenische Charakterisierung ausgewählter Hautpflegeprodukte, Pharm. Ztg. **142**, 4015-4019 (1997)
- 152 Gohla, S.H.: Multiple Emulsionen vom Typ Wasser-in-Öl-in-Wasser in Kosmetika, in: Müller, R.H.; Hildebrand, G.E. (Eds.): Pharmazeutische Technologie: Moderne Arzneiformen, Wiss. Verlagsges. Stuttgart 1998
- 153 Herbert, W.J.: Multiple Emulsions, Lancet **11**, 771 (1965)
- 154 Gohla, S.H.; Nielsen, J.: Partial phase solu-inversion technology (PPSIT), SOFW-Journal **121**, 701-713 (1995)
- 155 Daniels, R.: Neue Anwendungsformen bei Sonnenschutzmitteln, Apotheker J. **19**, 22 - 28 (1997)
- 156 Huang, C.: Studies on phosphatidylcholine vesicles. Formation and physical characterization, Biochemistry **8**, 344-351 (1969)
- 157 Lehmann, O.: Neue Untersuchungen über flüssige Kristalle. II. Teil, Carl Winter's Universitätsbuchhandlung, Heidelberg 1912
- 158 Bangham, A.D.; Horne, R.W.: Negative staining of phospholipids and their structural modification by surface-active agents as observed in the electron microscope, J. Mol. Biol. **8**, 660-668 (1964)
- 159 Bangham, A.D.; Standish, M.M.; Watkins, J.C.: Diffusion of univalent ions across lamellae of swollen phospholipids, J. Mol. Biol. **13**, 238-252 (1965)
- 160 Bangham, A.D.: Liposomes: The Babraham connection, Chem. Phys. Lipids **64**, 275-285 (1993)
- 161 Ghyczy, H.: Arzneimittel mit Phosphatidylcholin und Liposomen: Entwicklung, Bewertung, Perspektiven, in: Müller, R.H.; Hildebrand, G.E.: Pharmazeutische Technologie: Moderne Arzneiformen, Wiss. Verlagsges. Stuttgart 1998
- 162 Lasch, J.; Laub, R.; Wohlrab, W.: How deep do intact liposomes penetrate into human skin? J. Control. Rel. **18**, 55-58 (1991)
- 163 Schubert, R.: Liposomes in topical applications and their mode of action in the skin, Arch. Pharm. **324**, 627-633 (1991)
- 164 Lasch, J.; Bouwstra, J.: Interaction of external lipids (lipid vesicles) with the skin, Liposome Res. **5**, 543-569 (1995)

- 165 Kriwet, K.; Müller-Goymann, C.C.: Diclofenac release from phospholipid drug systems and permeation through excised human stratum corneum, *Int. J. Pharm.* **125**, 231-242 (1995)
- 166 Cevc, G.: Transfersomes, liposomes and other lipid suspensions on the skin: Permeation enhancement, vesicle penetration, and transdermal drug delivery, *Crit Rev. Therapeut. Drug Car. Syst.* **13**, 257-388 (1996)
- 167 Foldvari, M.; Gesztes, A.; Mezei, M.: Dermal drug delivery by liposome encapsulation: clinical and electronmicroscopical studies; *J. Microencapsulation* **7**, 479-489 (1990)
- 168 Zellmer, S.; Pfeil, W.; Lasch, J.: Interaction of phosphatidylcholine liposomes with the human stratum corneum, *Biochem. Biophys. Acta* **1237**, 176 (1995)
- 169 Imokawa, G.; Kuno, H.; Kawai, M.: Stratum corneum lipids serve as bound – water modulator through the formation of multi-lamellae structure in human stratum corneum, *J. Invest. Dermatol.* **96**, 845 (1991)
- 170 Hofland, H.E.J.; Bouwstra, J.A.; Spies, F.; Boddé, E.; Nagelkerke, J.F.; Cullander, C.; Junginger, H.E.: Interaction between non-ionic surfactant vesicles and human stratum corneum in vitro, *J. Liposome Res.* **5**, 241-263 (1995)
- 171 Schubert, R.: Liposomen in Arzneimitteln, in: Müller, R.H.; Hildebrand, G.E.: *Pharmazeutische Technologie: Moderne Arzneiformen*, Wiss. Verlagsges. Stuttgart 1998
- 172 Holman, B.P.; Spies, F.; Boddé, H.E.: An optimized freeze fracture replication procedure for human skin, *J. Invest. Dermatol.* **94**, 332 (1990)
- 173 Schubert, R.; Joos, M.; Deicher, M.; Magerle, R.; Lasch, J.: Destabilization of egg lecithin liposomes on the skin after topical application measured by perturbed gamma gamma angular correlation spectroscopy, *Biochem. Biophys. Acta* **1150**, 162 (1993)
- 174 Meybeck, A.: Past, present and future of liposome cosmetics, in: Braun-Falco, O.; Korting, H.C.; Maibach, H.I. (Eds.): *Liposome Dermatics*, Springer, Berlin 1992
- 175 Mezei, M.; Gulasekharan, Y.: Liposomes – A selective drug delivery system for the topical route of administration: gel dosage form, *J. Pharm. Pharmacol.* **34**, 473-474 (1982)
- 176 Kriftnier, R.W.: Liposome production. The ethanol injection technique and the development of the first approved liposome dermatic, in: Braun-Falco, O.; Korting, H.C.; Maibach, H.I.: *Liposome dermatics*, Springer, Berlin 1992
- 177 Neff, R.: Feasibility of topical liposome drugs produced on an industrial scale, *Adv. Drug Del. Rev.* **18**, 343-347 (1996)
- 178 Raab, W.: Liposomen in Dermatologie und Kosmetik – Erwartungen und Realität, *Pharm. Ztg.* **136**, 2129-2142 (1991)
- 179 Thiele, B.; Ghyczy, M.; Lunow, C.; Teichert, H.M.; Wolff, H.H.: Influence of phospholipide liposomes (PLL) on UVB – induced erythema formation, *Arch. Dermatol. Res.* **285**, 428-431 (1993)
- 180 Korting, H.C.; Schäfer-Korting, M.; Hart, H.; Laux, P.; Schmid, M.: Anti-inflammatory activity of hamamelis distillate applied topically to the skin: Influence of vehicle and dose, *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **44**, 315-318 (1993)
- 181 Treffel, P.; Gabard, B.: Skin penetration and sun protection factor of ultra-violet filters from two vehicles, *Pharm. Res.* **13**, 770-774 (1996)
- 182 Huber, P.A.; Gabard, B.: Liposomen in der Dermokosmetik, *Hautnah Dermatologie* **3**, 128-

- 131 (1997)
- 183 Nattermann Phospholipid GmbH: Produktinformation Natipide II, April 1996
- 184 Rades, T.; Gerke, A.; Schütze, W.; Müller-Goymann, C.C.: Characterization of commercial liposome spray, *Pharmazie* **52**, 44-53 (1997)
- 185 Mezei, M.: Liposomes as a skin drug delivery system, in: Breimer, D.D.; Speiser, R. (Eds.): *Topics in Pharmaceutical Sciences*, Elsevier, Amsterdam 1985
- 186 Mezei, M.: Liposomes in the topical application of drugs: a review, in: Gregoriadis, G. (Eds.): *Liposomes as drug carriers*, J. Wiley & Sons, New York 1988
- 187 Hanel, H.; Braun, B.; Jovic, N.: Comparative activity of a liposomal and conventional econazole preparation for topical use according to a guinea pig tinea a model, in: *Liposome Dermatics*, Griesbach Conference 1992
- 188 Škalco, N.; Cajkovac, M.; Jelšenjak, I.: Liposomen with clindamycin hydrochloride in the therapy of acne vulgaris, *Int. J. Pharmaceut.* **85**, 97 (1992)
- 189 Price, C.I.; Horton, J.W.; Baxter, C.R.: Topical liposomal delivery of antibiotics in soft tissue infection, *J. Surg. Res.* **49**, 174 (1990)
- 190 Kobrinskii, G.D.; Melnikov, V.R.; Kulakov, V.N.; Lvov, N.D.; Bolotin, I.; Barinskii, J.F.M.: Treatment of experimental genital herpes with liposomal interferon, *Biomed. Sci.* **2**, 29 (1991)
- 191 Melnikov, V.R.; Kobrinskii, G.D.; Lvov, N.D.; Bolotin, I.M.; Barinskii, J.F.M.: Treatment of experimental genital herpes with liposomal interferon, *Vstn. Akad. Med. Nauk SSSR* **35** (1990)
- 192 Patel, H.M.: Liposomes as a controlled – release system, *Biochem. Soc. Trans.* **13**, 513 (1985)
- 193 Egbaria, K.; Ramachandran, C.; Weiner, N.: Topical delivery of cyclosporin: evaluation of various formulations using in vitro diffusion studies in hairless mouse skin, *Skin Pharmacol.* **3**, 21 (1990)
- 194 Egbaria, K.; Ramachandran, C.; Weiner, N.: Topical application of liposomally entrapped cyclosporin evaluated by in vitro diffusion studies with human skin, *Skin Pharmacol.* **4**, 21 (1991)
- 195 Dowton, S.M.; HU, Z.; Ramachandran, C.; Wallach, D.F.H.; Weiner, N.: Influence of liposomal composition on topical delivery of encapsulated cyclosporin A. I. An in vitro study using hairless mouse skin, *Stp Pharma. Sci.* **3**, 404 (1993)
- 196 Planas, M.E.; Gonzalez, P.; Rodriguez, I.; Sanchez, S.; Cevc, G.: Noninvasive percutaneous induction of topical analgesia by a new type of drug carrier, and prolongation of local pain insensitivity by anesthetic liposomes, *Anesth. Analg.* **75**, 615 (1992)
- 197 Foldvari, M.; Gesztes, A.; Mezei, M.: Dermal drug delivery by liposome encapsulation: chlinical and electron microscopic studies, *J. Microencapsul.* **7**, 497 (1990)
- 198 Sharma, B.B.; Jain, S.K.; Kyas, S.P.: Topical liposome system bearing local anaesthetic lignocaine preparation and evaluation, *J. Microencapsul.* **11**, 279 (1994)
- 199 Gesztes, A.; Mezei, M.: Topical anaesthesia of the skin by liposome – encapsulated tetracain, *Anesth. Analg.* **67**, 1079 (1988)
- 200 Nacucchio, M.; Dirocco, P.; Lairon, F.; Marinez, B.; Pena, M.: Tetracaine release profile from topical liposome formulation, *Proc. Int. Symp. Contr. Rel. Bioact. Mat.* **21**, 230 (1995)

- 201 Natsuki, T.; Tomomichi, S.; Matsuo, R.; Takabatake, E.; Nakanishi, M.: Absorption und excretion of indomethacin gel ointment containing egg lecithin, *J. Pharmacobio. Dyn.* **9**, 12 (1986)
- 202 Michel, C.; Purmann, T.; Mentrup, E.; Michel, G.; Kreuter, J.: Effect of liposomes on percutaneous penetration of lipophilic materials, *Int. J. Pharmaceut.* **84**, 93 (1992)
- 203 Nishihata, T.; Kotera, K.; Nakano, Y.; Yamazaki, M.: Rat percutaneous transport of diclofenac and influence of hydrogenated soya phospholipid, *Chem. Pharm. Bull.* **35**, 3807 (1987)
- 204 Nishihata, T.; Kamaada, A.; Sakai, K.; Takahashi, K.; Matsumoto, K.; Shinozaki, K.; Tabata, Y.; Keigami, M.; Miyagi, T.; Tatsumi, N.: Percutaneous absorption of diclofenac in rats and humans: aqueous gel formulation, *Int. J. Pharmaceut.* **46**, 1 (1988)
- 205 Lasch, J.; Wohlrab, W.: Liposome-bound cortisol: a new approach to cutaneous therapy, *Biomed. Biochim. Acta* **45**, 1295 (1986)
- 206 Wohlrab, W.; Lasch, J.: The effect of liposomal incorporation of topically hydrocortisone on its serum concentration and urinary excretion, *Dermatol. Monatsschr.* **175**, 348-352 (1989)
- 207 Saket, M.; Kellaway, I.: Hydrocortisone octanoate delivery from liposomes: in vivo and in vitro studies, *Egypt. J. Pharm. Sci.* **32**, 17 (1991)
- 208 Jacobs, M.; Martin, G.P.; Mariott, C.: Effect of phosphatidyl choline on the topical bioavailability of corticosteroids assessed by the human skin blanching assay, *J. Pharm. Pharmacol.* **40**, 829 (1988)
- 209 Toulon, A.; Besnard, M.; Leclerc, B.; Weingarten, C.; Salindrouin, D.; Couarraze, G.: Modification of estradiol percutaneous absorption by liposomal entrapment, *Stp. Pharma. Sci.* **1**, 76 (1991)
- 210 Vermorken, A.J.; Hukkelhoven, M.W.; Vermeesch-Markslag, A.M.; Goos, C.M.; Wirtz, P.; Ziegenmeyer, J.: The use of liposomes in the topical application of steroids, *J. Pharm. Pharmacol.* **36**, 334 (1984)
- 211 Knepp, V.M.; Hinz, R.; Szoka, F.C.; Guy, R.H.: Controlled drug release from novel liposomal delivery system. I. Investigation of transdermal potential, *J. Contr. Rel.* **5**, 211 (1988)
- 212 Knepp, V.M.; Szoka, F.C.; Guy, R.H.: Controlled drug release from a novel liposomal delivery system. II. Transdermal delivery characteristics, *J. Control Rel.* **12**, 25 (1990)
- 213 Rowe, T.Z.; Mezei, M.; Hilchie, J.: Treatment of hirsutism with liposomal progesterone, *Prostate* **5**, 346 (1986)
- 214 Moreno, G.: Photosensitization of mammalian cells by psoralens and porphyrins, *Biochimie* **68**, 869 (1986)
- 215 Davis, R.; Straight, R.; Kereszti, Z.: Comparison of photosensitizers in saline and liposomes for photodynamic therapy and skin phototoxicity, *Laryngoscope* **100**, 682 (1990)
- 216 Lefaix, J.L.; Delanian, S.; Leplat, J.J.; Martin, Y.; Hoffschir, D.; Daburon, F.; Baillet, F.: Radiation, induced cutaneo, muscular fibrosis. II. Major therapeutic efficacy of liposomal Cu/Zn superoxide dismutase, *Bull. Cancer* **80**, 799 (1993)
- 217 Miyachi, Y.; Imamura, S.; Niwa, Y.: Decreased skin superoxide dismutase activity by a single exposure of ultraviolet radiation is reduced by liposomal superoxide dismutase pretreatment, *J. Invest. Dermatol.* **89**, 111 (1987)

- 218 Cevc, G.; Bleane, A.: Lipid vesicles penetrate into skin owing to the transdermal osmotic gradients and hydration force, *Biochim. Biophys. Acta* **1104**226-232 (1992)
- 219 Cevc, G.: Dermal insulin, in: Berger, M.; Gries, A. (Eds.): *Frontiers in insulin*, Themie, Stuttgart 1993
- 220 Cevc, G.; Gebauer, G.; Schätzlein, G.; Blume, A.: Ultraflexible vesicles, transfersomes, have an extremely low permeation resistance and transport therapeutic amounts of insulin across the intact mammalian skin, *Biotechnol.* (1996)
- 221 Weiner, N.; Williams, N.; Birch, G.; Ramachandran, C.; Shipman, C.; Flynn, G.: Topical delivery of liposomally encapsulated interferon evaluated in a cutaneous herpes guinea pig model, *Antimicrob. Agents Chemother.* **33**, 1217 (1989)
- 222 Du Plessis, J.; Egbaria, K.; Rachmandran, C.; Weiner, N.: Topical delivery of liposomally encapsulated gamma-interferon, *Antiviral. Res.* **18**, 259 (1992)
- 223 Artmann, C.; Roeding, J.; Ghyczy, M.; Pratzel, H.G.: Liposomes from soya phospholipids as percutaneous drug carriers 1st communication: Qualitative in vivo investigations with antibody-loaded liposomes, *Arzneim.-Forsch.* **40**, 1363 (1990)
- 224 Balsari, A.L.; Morelli, A.D.; Menard, S.; Veronesi, U.; Colnaghi, M.I.: Protection against doxorubicin induced alopecia in rats by liposome, entrapped monoclonal antibodies, *FASEB J.* **8**, 226 (1994)
- 225 Yarosh, D.; Alas, L.G.; Yee, V.; Oberyszyn, A.; Kibitel, J.T.; Mitchell, D.; Rosenstein, R.; Spinowitz, A.; Citron, M.: Pyrimidine dimer removal enhanced by DNA repair liposomes reduces the incidence of UV skin cancer in mice, *Cancer Res.* **52**, 4227 (1992)
- 226 New, R. R. C. (Ed.): *Liposomes a practical approach*, IRL Press, Oxford 1990
- 227 Herbort, J.: *Liposomen haltige Formulierung für Hair Conditioning*, Dissertation, Freie Universität Berlin, Berlin 1997
- 228 Avestin (Canada) Produktinformation zum Membranextruder LiposoFast®-Basic und EmulsiFlex B3, www.Avestin.com, 2000
- 229 Hunter, G. W., Squier, T. C.: Phospholipid acylchain rotational dynamics are independent of headgroup structure in unilamellar vesicles containing binary mixtures of dioleoyl-phosphatidylcholine and dioleoyl-phosphatidylethanolamine, *Biochim. Biophys. Acta* **1415**, 63 – 76 (1998)
- 230 Pejaver, S. K.: Role of Liposome Composition on Drug Stability, in Gregoriadis, G. (Eds.): *Liposome Technology*, p 275 – 292, CRC Press Inc, Boca Raton 1993
- 231 Hope, M. J.; Nayar, R.; Mayer, L.D.; Cullies, P.: Reduction of liposome size and preparation of unilamellar vesicles by extrusion techniques, in Gregoriadis, G. (Eds.): *Liposome Technology*, p 123 - 139, CRC Press Inc, Boca Raton 1993
- 232 Nagumo, A.; Sato, Y.; Suzuki, Y.: Electron Spin Resonance Studies of Phosphatidylcholine Interacted with Cholesterol and with a Hopanoid in Liposomal Membrane, *Chem. Pharm. Bull.* **39**, 3071 - 3074 (1991)
- 233 Marsh, D.; Smith, I. P.: An interacting spin label study of the fluidizing and condensing effect of cholesterol on lecithinn bilayers, *Biochim. Biophys. Acta* **198**, 133 – 144 (1973)
- 234 Karau, C.; Petszulat, M.; Schmidt, P. C.: Preparation and Stability of interferon- α -containing Liposomes, *Int. J. Pharm.* **128**, 89-98 (1996)

- 235 Weiner, N.: Targeted follicular delivery of macromolecules via liposomes, *Int. J. Pharm.* **162**, 29-38 (1998)
- 236 Blume, A.; Jansen, M.; Ghyczy, M.; Garreiss, J.: Interaction of Phospholipid Liposomes with Lipid Model Mixtures for SC Lipids, *Int. J. Pharm.* **99**, 219- 228 (1993)
- 237 Philippot, J. R.; Liautard, J. P.: A mild method for the preparation of very large unilamellar liposomes, in Gregoriadis, G. (Eds.): *Liposome Technology*, p 81 – 98, CRC Press Inc, Boca Raton 1993
- 238 Shinitzky, M.; Barenholz, Y.: Fluidity parameters of lipid regions determined by Fluorescence Polarisation, *Biochim. Biophys. Acta* **515**, 367 – 394 (1978)
- 239 Lentz, B.R.: Membrane “fluidity“ as detected by diphenylhexatriene probes, *Chem. Phys. Lipid.* **50**, 171-190 (1989)
- 240 MacDonald, R. C.; MacDonald, R. I.; Menco, B. P. M.; Takeshita, K.; Subbarao, N. K.; Hu, L.: Small-volume extrusion apparatus for preparation of large, unilamellaar vesicles, *Biochim. Biophys. Acta* **1061**, 297 – 303 (1991)
- 241 Berger, N.; Sachse, A.; Bender, J.; Schubert, R., Brandl, M.: Filter extrusion of liposomes using different devices: comparison of liposome size, encapsulation efficiency, and process characteristics, *Int. J. Pharm.* **223**, 55-68 (2001)
- 242 Singh, R.; Vyas, S. P.: Topical liposomal system for localized and controlled drug delivery, *J. Dermatological Science* **13**, 107 – 111 (1996)
- 243 Hofland, H. E.; Bouwstra, J. A.; Boddé, H. E.; Spies, F.; Junginger, H. E.: Interactions between liposomes and human stratum corneum in vitro: freeze fracture electron microscopical visualization and small angle X-ray scattering studies, *Brit. J. Dermatol.* **132**, 853 – 856 (1995)
- 244 Blume, A.; Jansen, M.; Ghyczy, M.; Gareiss, J.: Interaction of phospholipid liposomes with lipid model mixtures for stratum corneum lipids, *Int. J. Pharm* **99**, 219 – 228 (1993)
- 245 Gehring, W.; Ghyczy, M.; Gloor, M.; Heitzler, Ch.; Röding, J.: Significance of Empty Liposomes Alone and as Drug Carriers in Dermotherapy, *Arzneim.-Forsch.* **40**, 1368 – 1371 (1990)
- 246 van den Bergh, B. A. I.; Vroom, J.; Gerritsen, H.; Junginger, H. E.; Bouwstra, J. A.: Interaction of elastic and rigid vesicles with human skin in vitro: electron microscopy and two photon excitation microscopy, *Biochim. Biophys. Acta* **1461**, 155 – 173 (1999)
- 247 Honzak, L.; Sentjerc, M.; Swartz, H. M.: In vivo EPR of topical delivery of a hydrophilic substance encapsulated in multilamellar liposomes applied to the skin of hairless and normal mice, *J. Control. Rel.* **66**, 221 – 228 (2000)
- 248 Kirjavainen, M.; Urtti, A.; Valjakka-Koskela, R.; Kiesvaara, J.; Mönkkönen, J.: Liposome-skin interactions and their effects on the skin permeation of drugs, *Eur. J. Pharm. Sci.* **7**, 279 – 286 (1999)
- 249 Yokomizo, Y.: Effects of phospholipids on the percutaneous penetration of drugs through the dorsal skin of the guinea pig, in vitro. 3. The effect of phospholipids on several drugs having different polaities, *J. Control. Rel.* **42**, 217 – 228 (1996)
- 250 Michel, C.; Purmann, T.; Mentrup, E.; Seiller, E.; Kreuter, J.: Effect of liposomes on percutaneous penetration of lipophilic materials, *Int. J. Pharm* **84**, 93 – 105 (1992)

- 251 Wilisch, I. L.; Müller-Goymann, C. C.: Correlation of colloidal microstructure, drug release and permeation through excised human skin, *Int. J. Pharm.* **96**, 79 – 84 (1993)
- 252 Schmid, M.-H.; Korting, H. C.: Therapeutic progress with topical liposome drugs for skin disease, *Advanced Drug Delivery Reviews* **18**, 335-342 (1996)
- 253 P.E.S.T.; Public EPR Software Tools; National Institute of Environmental Health Sciences; Dave Duling[®] (1996)
- 254 Weber, S: Beweglichkeit paramagnetischer Sondenmoleküle in mizellaren Lösungen: eine ESR-spektroskopische Untersuchung, Verlag Shaker, Aachen 1993
- 255 Galla, H. J.: Spektroskopische Methoden in der Biochemie, Georg Thieme Verlag Stuttgart 1988
- 256 Bucke, W.: Dissertationsschrift, FU Berlin
- 257 Mezei, M.; Gualsekham, V.: Liposomes- a selective drug delivery system for the topical route of administration, *Life Sci.* **26**, 1473 - 1474 (1980)
- 258 Ganesan, M. G.; Weiner, N. D.; Flynn, G. L.; Ho, N. F. H.: Influence of liposomal drug entrapment on percutaneous absorption, *Int. J. Pharm.* **20**, 139 – 154 (1984)
- 259 Ho, N. F. H.; Ganesan, M. G.; Weiner, N. D.; Flynn, G. L.: Mechanisms of topical delivery of liposomally entrapped drugs, *J. Control. Rel.* **2**, 61 – 65 (1985)
- 260 Artmann, C.; Röding, J.; Ghyczy, M.; Pratzel, H. G.: Einfluss verschiedener Liposomenzubereitungen auf die Hautfeuchtigkeit, *Parfum Kosmet.* **5**, 324 – 325 (1990)
- 261 Schubert, R.; Joos, M.; Deicher, M.; Magerle, R.; Lasch, J.: Destabilization of egg lecithin liposomes on the skin after topical application measured by gamma gamma angular correlation spectroscopy (pac) with 111 In, *Biochim. Biophys. Acta* **1150**, 162 - X (1993)
- 262 Holman, B. P.; Spies, F.; Bodde, H. E.: An optimized freeze fracture replication procedure for human skin, *J. Invest. Dermatol.* **94**, 332 – X, (1990)
- 263 Wabel, C.: Influence of Lecithin on Structure and Stability of Parenteral Fat Emulsions, Dissertationsschrift, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, 1998
- 264 Oussoren, C.; Zuidema, J.; Crommelin, D.J.A.; Storm, G.: Lymphatic uptake and biodistribution of liposomes after subcutaneous injection. II. Influence of liposomal size, lipid composition and lipid dose, *Biochim. Biophys. Acta* **1328**, 261-272 (1997)
- 265 Babai, I.; Samira, S.; Barenholz, Y.; Zakay-Rones, Z.; Kedar, E.: A novel subunit vaccine composed of liposome-encapsulated haemagglutinin/neuramidase and IL-2 or GM-CSF. I Vaccine characterisation and efficacy studies in mice, *Vaccine* **17**, 1223-1238 (1999)
- 266 Corvo, M.L.; Boermann, O.C.; Oyen, W.J.G.; Jorge, J.C.S.; Cruz, M.E.M.; Crommelin, D.J.A.; Storm, G.: Subcutaneous administration of superoxide dismutase entrapped in long circulating liposomes: In vivo fate and therapeutic activity in an inflammation model, *Pharm. Res.* **17**, 600-606 (2000)
- 267 Hoppe, W., Lohmann, W., Markl, H. und Ziegler, H. (Eds.) *Biophysik*, Springer, Berlin, 275 - 289 (1982)
- 268 Gütt, S.: Rheologische in vivo-Untersuchungen an der menschlichen Haut mit nichtinvasiven Verfahren, Dissertationsschrift, Universität Hamburg 1998
- 269 Fuchs, J.; Mehlhorn, R. J.; Packer, L.: Free radical reduction mechanisms in mouse epidermis

- and skin homogenates, *J. Invest. Dermatol.* **93**, 633 – 640 (1989)
- 270 Fuchs, J.; Groth, N.; Herrling, T.: Cutaneous Tolerance to Nitroxide Free Radicals in Human Skin, *Free Rad. Biol. Med.* **24**, 643 – 648 (1998)
- 271 Krause, S. A.: Entwicklung und Charakterisierung von Mikroemulsionen zur dermalen Applikation von Arzneistoffen, Dissertationsschrift, Martin-Luther-Universität Halle Wittenberg, Halle, 2001
- 272 Barry, B. W.: Mode of action of penetration enhancers in human skin, *J. Control. Rel.* **6**, 85 – 97 (1987)
- 273 Assmusen, B.: Transdermale Therapeutische Systeme, *DAZ* **26**, 72 – 73 (1998)
- 274 Vianello, F.; Momo, F.; Scarpa, M.; Rigo, A.: Kinetics of nitroxide spin label removal in biological systems: An in vitro and in vivo ESR study, Magnetic resonance imaging, **13**, 219 – 226 (1995)
- 275 Wester, R. C.; Christoffel, J.; Hartway, T.; Poblete, N.; Maibach, H. I.; Forsell, J.: Human Cadaver skin Viability for In Vitro Percutaneous Absorption: Storage and Detrimental Effects of Heat-Separation and Freezing, *Pharm. Res.* **15**, 82 – 84 (1998)
- 276 Collier, S. W.; Sheikh, N. M.; Sakr, A.; Lichtin, J. L.; Stewart, R. F.; Bronaugh, R. L.: Maintenance of Skin Viability during in Vitro Percutaneous Absorption/Metabolism studies, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **99**, 522 – 533 (1989)
- 277 van Slooten, M. L.; Boerman, O.; Romoren, K.; Kedar, E.; Crommelin, D. J. A.; Storm, G.: Liposomes as sustained release system for human interferon- γ : biopharmaceutical aspects, *Biochim. Biophys. Acta* **1530**, 134 – 145 (2001)
- 278 Ye, Q.; Ashermann, J.; Stevenson, M.; Brownson, E.; Katre, N. V.: DepoFoam™ technology: a vehicle for controlled delivery of protein and peptide drugs, *J. Control. Rel.* **64**, 155 – 166 (2000)
- 279 Oussoren, C.; Eling, W. M. C.; Crommelin, D.J.A.; Storm, G.; Zuidema, J.: The influence of the route of administration on the potential of liposomes to protect tissue against local toxicity of two antitumor drugs, *Biochim. Biophys. Acta* **1369**, 159 – 172 (1998)
- 280 Wilisch, I. L.; Müller-Goymann, C. C.: Correlation of colloidal microstructure, drug release and permeation through excised human skin, *Int. J. Pharm.* **96**, 79 – 84 (1993)
- 281 Margalit, R.: Liposome-Mediated Drug Targeting in Topical and Regional Therapies, *Crit. Rev. Therapeut. Drug Car. Syst.* **12**, 233 – 261 (1995)
- 282 Kitagawa, S.; Ikarashi, A.: Analysis of Electron Spin Resonance Spectra of Alkyl Spin Labels in Excised Guinea Pig Dorsal Skin, Its Stratum Corneum, Delipidized Skin and Stratum Corneum Model Lipid Liposomes, *Chem. Pharm. Bull.* **49**, 165 – 168 (2001)
- 283 Raab, W.: Liposomen – eine neue Form dermatologischer Wirkstoffträger, *Ärztliche Kosmetologie* **18**, 213 – 224 (1988)
- 284 Jeßberger, B.: Therapie des Syndroms der trockenen Haut; *Z. Hautkrankheiten* **63**, 12 – 15 (1988)
- 285 Kusnetzov, A.N.; Wasserman, A.M.; Volkov, A.U.; Korst, N.N.: Determination of rotational correlation time of nitric oxide radicals in a viscous medium, *Chem. Phys. Lett.* **12**, 103 – 106 (1971)
- 286 Kovarskii, A. L.; Wassermann, A. M.; Buchachenko, A. L.: The Study of Rotational and

- Translational Diffusion Constants for Stable Nitroxide Radicals in Liquids and Polymers, *J. Magn. Reson.* **7**, 225 – 237 (1972)
- 287 Freed, J. H.; Fraenkel, G. K.: Theory of Linewidths in Electron Spin Resonance Spectra, *J. Chem. Phys.* **19**, 326 – 348 (1963)
- 288 Quan, D.; Maibach, H. I.: An electron spin resonance study: I. Effect of Azone[®] on 5-Doxyl stearic acid-labeled human stratum corneum, *Int. J. Pharm* **104**, 61 – 72 (1994)
- 289 Hubbell, W. L., McConnell, H. M.: Molecular Motion in Spin-Labeled Phospholipids and Membranes, *J. Am. Chem. Soc.* **93**, 314 – 326 (1971)
- 290 Griffith, O. H.; Jost, C. P.: Lipid Spin Labels in Biological Membranes, in Berliner, L. J. (Eds.): *Spin Labeling*, Academic Press, New York (1976)
- 291 Gaffney, B. J.: Practical Considerations for the Calculation of Order Parameters for Fatty Acid Spin Probes or Phospholipid Spin Labels in Membranes, in Berliner, L. J. (Eds.): *Spin Labeling*, Academic Press, New York (1976)
- 292 Alonso, A.; Meirelles, N. C.; Tabak, M.: Effect of hydration upon the fluidity of intercellular membranes of stratum corneum: an EPR study, *Biochim. Biophys. Acta* **1237**, 6 – 15 (1995)
- 293 Seelig, J.: Anisotropic Motion in Liquid Crystalline Structures, in Berliner, L. J. (Eds.): *Spin Labeling*, Academic Press, New York (1976)
- 294 Taylor, M. G.; Smith, I. C. P.: The Fidelity of Response by Nitroxide Spin Probes to Changes in Membrane Organization, The Condensing Effect of Cholesterol, *Biochim. Biophys. Acta* **599**, 140 – 149 (1980)
- 295 Vrhovnik, K.; Kristl, J.; Sentjurc, M.; Smid-Korbar, J.: Influence of Liposome Bilayer Fluidity on the Transport of Encapsulated Substance into the Skin as Evaluated by EPR, *Pharm. Res.* **15**, 525 – 530 (1998)
- 296 Slotte, J. P.: Lateral domain formation in mixed monolayers containing cholesterol and dipalmitoylphosphatidylcholine or N-palmitoylsphingomyelin, *Biochim. Biophys. Acta* **1235**, 419 – 427 (1995)
- 297 Demel, R. A.; De Kruyff, B.: The function of sterols in membranes, *Biochim. Biophys. Acta* **457**, 109 – 132 (1972)
- 298 Alonso, A.; dos Santos, W. P.; Leonor, S. J.; dos Santos, J. G.; Tabak, M.: Stratum corneum Protein Dynamics as evaluated by a Spin-Label Maleinimide Derivative: Effect of Urea, *Biophysical Journal* **81**, 3566 – 3576 (2001)
- 299 Alonso, A.; Meirelles, N. C.; Tabak, M.: Lipid chain dynamics in stratum corneum studied by spin label electron paramagnetic resonance, *Chem. Phys. Lipids* **104**, 101 – 111 (2000)
- 300 Gay, C. L.; Murphy, T. M.; Hadgraft, J.; Kellaway, I. W.; Evans, J. C.; Rowlands, C. C.: An electron spin resonance study of skin penetration enhancers, *Int. J. Pharm.* **49**, 39 – 45 (1989)
- 301 Mizushima, J.; Kawasaki, Y.; Tabohashi, T.; Kitano, T.; Sakamoto, K.; Kawashima, M.; Cooke, R.; Maibach, H. I.: Effect of surfactants on human stratum corneum: electron paramagnetic resonance study, *Int. J. Pharm.* **197**, 193 – 202 (2000)
- 302 Ogiso, T.; Iwaki, M.; Bechako, K.; Tsutsumi, Y.: Enhancement of Percutaneous Absorption by Laurocapram, *J. Pharm. Sci.* **81**, 762 – 767 (1992)
- 303 Imokawa, G.; Kuno, H.; Kawai, M.: Stratum corneum lipids serve as bound-water modulator through the formation of multi-lamellae structure in human stratum corneum, *J. Invest.*

- Dermatol. **96**, 845 – X (1991)
- 304 Ogiso, T.; Niinaka, N.; Iwaki, M.: Mechanism for enhancement effect of lipid disperse system on percutaneous absorption, *J. Pharm. Sci.* **85**, 57 – 64 (1996)
- 305 Bouwstra, J. A.; Hofland, H. E. J.; Spies, F.; Gooris, G. S.; Junginger, H. E.: Changes in the structure of the human Stratum corneum induced by liposomes, in: Braun-Falco, O.; Korting, H. C.; Maibach, H. I. (Eds): *Liposome dermatics*, Springer, Heidelberg 1992
- 306 Tanojo, H.; Bos-van Geest, A.; Bouwstra, J. A.; Junginger, H. E.; Boddé, H. E.: In vitro human skin barrier perturbation by oleic acid: Thermal analysis and freeze fracture electron microscopy studies, *Thermochim. Acta* **293**, 77 – 85 (1997)
- 307 Tanojo, H.; Bouwstra, J. A.; Junginger, H. E.; Boddé, H. E.: In Vitro Human Skin Barrier Modulation by Fatty Acids; Skin Permeation and Thermal Analysis Studies, *Pharm. Res.* **14**, 42 – 49 (1997)
- 308 Walker, M.; Hadgraft, J.: Oleic acid – a membrane fluidiser or fluid within the membrane ?, *Int. J. Pharm.* **71**, R1 – R4 (1991)
- 309 Kuppusamy, P.; Wang, P.; Shankar, R. A.; Ma, L.; Trimble, C. E.; Hsia, C. J. C.; Zweier, J. L.: In Vivo Topical EPR Spectroscopy and Imaging of Nitroxide Free Radicals and Polynitroxyl-Albumin, *MRM* **40**, 806 – 811 (1998)
- 310 Herrling, T.; Fuchs, J.; Groth, N.: Kinetic Measurements Using EPR Imaging with a Modulated Field Gradient, *J. Magn. Reson.* **154**, 6 – 14 (2002)
- 311 Gabrijelcic, V.; Sentjurs, M.; Schara, M.: Liposomes entrapped molecules penetration into the skin measured by nitroxide reduction kinetic imaging, *Period. Biolog.* **93**, 245 – 246 (1991)
- 312 Michel, C.; Groth, N.; Herrling, T.; Rudolph, P.; Fuchs, J.; Kreuter, J.; Freisleben, H.-J.: Penetration of spin-labeled retinoic acid from liposomal preparations into the skin of SKH1 hairless mice Measurement by EPR tomography, *Int. J. Pharm.* **98**, 131 – 139 (1993)
- 313 Freisleben, H.-J.; Groth, N.; Fuchs, J.; Rudolph, P.; Zimmer, G.; Herrling, T.: Penetration of Spin-labeled Dihydrolipoate into the skin of Hairless Mice, Modification of epidermal and dermal polarity, *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* **44**, 1047 – 1050 (1994)
- 314 Kroll, C.; Herrmann, W.; Stößer, R.; Borchert, H.-H.; Mäder, K.: Influence of drug treatment on the microacidity on rat and human skin – an in vitro electron spin resonance imaging study, *Pharm. Res.* **18**, 525 – 530 (2001)
- 315 Budil, D. E.; Lee, S.; Saxena, S.; Freed, J. H.: Nonlinear-least squares analysis of slow-motion EPR spectra in one and two dimensions using a modified Levenberg-Marquardt algorithm, *J. Magn. Reson.* **120**, 120 – 189 (1996)
- 316 Schneider, D. J.; Freed, J. H.: Calculating Slow Motional Magnetic Resonance Spectra, in: Schneider, F.; Plato, M. (Eds): *Elektronenspin-Resonanz - Experimentelle Technik*; Verlag Karl Thieme KG, München 1971
- 317 Schreier, H.; Bouwstra, J.: Liposomes and niosomes as topical drug carriers: dermal and transdermal drug delivery, *J. Control. Rel.* **30**, 1 – 15 (1994)
- 318 Lieken, J.; Schmitz, A.; Lippold, B. C.: Influence of lipophilic and hydrophilic vehicles in the permeability of the human skin in vivo, *Arch. Pharm.* **334**, 21 (2001)
- 319 Kim, M.-K.; Chung, S.-J.; Lee, M.-H.; Cho, A.-R.; Shim, C.-K.: Targeted and sustained delivery of hydrocortisone to normal and stratum corneum-removed skin without enhanced

- skin absorption using a liposome gel, *J. Control. Rel.* **46**, 243 – 251 (1997)
- 320 Fresta, M.; Puglisi, G.: Corticosteroid dermal delivery with skin-lipid liposomes, *J. Control. Rel.* **44**, 141 – 151 (1997)
- 321 Wohlrab, W.; Lasch, J.; Taube, K.-M.; Wozniak, K.-D.: Hautpermeation von liposomal inkorporiertem Hydrocortison, *Pharmazie* **44**, 333 – 335 (1989)
- 322 Brandt, O.: Vergleichende pharmakokinetische Untersuchungen zur perkutanen Resorption und zum Hautmetabolismus von Steroiden und steroidähnlichen Substanzen, Dissertationsschrift, Humboldt-Universität zu Berlin, 1996
- 323 Weil, J. A.; Bolton, J. R.; Wertz, J. E.: *Electron Paramagnetic Resonance - Elementary Theory and Practical Applications*, John Wiley & Sons, Inc., New York 1994
- 324 Sentjurs, M.; Vrhovnik, K.; Kristl, J.: Liposomes as a topical delivery system: the role of size on transport studied by the EPR imaging method, *J. Control. Rel.* **59**, 87 – 97 (1999)
- 325 Heymann, E.: *Haut, Haare und Kosmetik*, Hirzel, Stuttgart, 1994
- 326 Ranby, B.; Rabek, J. F.: *ESR Spectroscopy in Polymer Research*, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York 1977, pp. 11 - 38
- 327 Berliner, L.J.; Reuben, J. (Eds.): *Spin Labeling, Theory and applications in biological magnetic resonance*, Vol. 8; Plenum Press, New York – London 1989
- 328 Eaton, G. R.; Eaton, S. S.; Ohno, K. (Eds.): *EPR Imaging and in Vivo EPR*, CRC Press, Inc.; Boca Raton 1991
- 329 Schneider, F.; Plato, M.: *Elektronenspin-Resonanz - Experimentelle Technik*; Verlag Karl Thieme KG, München 1971
- 330 Maltempo, M. M.: Differentiation of spectral and spatial components in EPR imaging using 2-D image reconstruction algorithms, *J. Magn. Reson.* **69**, 156 – 161 (1986)
- 331 Eaton, G.R.; Eaton, S. S.; Maltempo, M. M.: Three approaches to spectral-spatial EPR imaging, *Appl. Radiat. Isot.* **40**, 1227 – 1231 (1989)
- 332 Maltempo, M. M.; Eaton, S. S.; Eaton, G. R.: Spectral-spatial two-dimensional EPR imaging, *J. Magn. Resn.* **72**, 449 – 455 (1987)
- 333 Maltempo, M. M.; Eaton, S. S.; Eaton, G. R.: Spectral-spatial imaging, in: Eaton, G.R.; Eaton, S. S.; Ohno, K. (Eds.): *EPR imaging and in vivo EPR*, CRC Press, Boca Raton 1991, pp. 135 – 143
- 334 Maltempo, M. M.; Eaton, S. S.; Eaton, G. R.: Spectral-spatial imaging, in: Eaton, G.R.; Eaton, S. S.; Ohno, K. (Eds.): *EPR imaging and in vivo EPR*, CRC Press, Boca Raton 1991, pp. 145 – 152
- 335 Komatsu, H.; Kitajima, A.; Okada, S.: Pharmaceutical Charakterization of Commercially Available Intravenous Fat Emulsions: Estimation of Average Particle Size, Size Distribution and Surface Potential Using Photon Correlation Spectroscopy, *Chem. Pharm. Bull.* **59**, 903 – 910 (1997)
- 336 Müller, R.H.; Schuhmann, R.: *Teilchengrößenmessung in der Laborpraxis*, Wiss. Verlagsges. Stuttgart 1996
- 337 Müller, R.H.: *Zetapotenzial und Partikelladung in der Laborpraxis*, Wiss. Verlagsges. Stuttgart 1996

- 338 Diederichs, J. E.: Surfactant-Liposome zur Behandlung des IRDS, Charakterisierung und Scaling-Up, Dissertation, Christian-Albrechts-Universität Kiel, 1993
- 339 Herbolt, J.: Liposomenhaltige Formulierungen für Hair Conditioning, Dissertation, Freie Universität Berlin, Berlin 1997
- 340 Tilcock, C.: Liposomal paramagnetic resonance contrast agents, in Gregoriadis, G. (Eds.): Liposome Technology, p 65 – 87, CRC Press Inc, Boca Raton 1993
- 341 Blume, G.; Schäfer, U.: Penetration of Liposomes with encapsulated Carboxyfluoresceine, Handout, 3rd World Meeting on Pharmaceutics Biopharmaceutics Pharmaceutical Technology, Berlin 2000
- 342 Meidan, V.M.; Docker, M.; Walmsley, A. D.; Irwin, W.J.: Low ultrasound as a Probe to Elucidate the Relative Follicular Contribution to Total Transdermal Absorption, Pharm. Res. **15**, 85-92 (1998)
- 343 CellSystems Biotechnologie Vertrieb GmbH (Deutschland), Produktinformation zum Advanced Skin Test 2000, 1999
- 344 Podaisky, H.P.; Huschka, Ch., Wohlrab, W.: Optimierung der topischen Therapie: Einsatz von *In-vitro*-Modellen, Pharmazie **54**, 12 (1999)
- 345 Plewig, G.; Jansen, T.; Schürer, N.Y.: Das Stratum corneum, Hautarzt **48**, 510-521 (1997)
- 346 Benford, D.J., Roguet, R., Southee, J.: Human Skin Models: A Diskussion Report, Toxicol. in vitro **11**, 589 – 590 (1997)
- 347 Goates, C.Y.; Knutson, K.: Enhanced permeation of polar compounds through human Epidermis, Biochim. Biophys. Acta **1195**, 169-179 (1994)
- 348 Kitano, Y.; Okada, N.: Separation of the epidermal sheet by dispase, Brit. J. Dermatol. **108**, 555-560 (1983)
- 349 Haigh, J. M.; Smith, E. W.: The selection and use of natural and synthetic membranes for in vitro diffusion experiments, Eur. J. Pharm. Sci. **2**, 311-330 (1994)
- 350 Noll, M.; Merkle, M.-L.; Kandsberger, M.; Matthes, T.; Fuchs, H.; Graeve, T.; Reconstructed Human Skin (AST-2000) as a Tool for Pharmaco-Toxicology, Hand-out, CellSystems Biotechnologie Vertrieb GmbH (Deutschland), Produktinformation zum Advanced Skin Test 2000, 1999
- 351 Wester, R. C.; Christoffel, J.; Hartway, T.; Poblete, N.; Maibach, H. I.; Forsell, J.: Human Cadaver Skin Viability for In Vitro Percutaneous Absorption: Storage and Detrimental Effects of Heat-Separation and Freezing, Pharm. Res. **15**, 82 – 84 (1998)

Publikationsliste

Posterabstracts und Proceedings

Moll, K-P.; Mäder, K.; Herrmann, W.; Kroll, C.; Müller, R. H.; Borchert, H.-H.: Spectral spatial imaging and penetration of liposomes into human skin, Proceedings des International Workshop on Techniques and Bio-Medical Applications of In Vivo EPR and PEDRI, 1999, Aberdeen, U.K.

Moll, K-P.; Mäder, K.; Herrmann, W.; Müller, R. H.; Borchert, H.-H.: EPRI – A Method for studying Drug delivery into the human skin noninvasively, Proceeding für 3rd World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics, Pharmaceutical Technology, 2000, Berlin

Moll, K-P.; Borchert, H.-H.; Mäder, K.: EPR Investigations on Biodegradable Nano- and Microparticles, Proceeding für 3rd World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics, Pharmaceutical Technology, 2000, Berlin

Moll, K-P.; Borchert, H.-H.; Utsumi, H.: Investigations on multilamellar liposomes after subcutaneous injection in mice by ESR-spectroscopy, Arch. Pharm. **334**, 79 (2001)

Herrmann, W.; Moll, K-P.; Stößer, R.; Borchert, H.-H.: On the molecular dynamics of selected spin labels in liposomal preparations applied to human skin as investigated using X-band ESR tomography: 2. Model systems, Arch. Pharm. **335**, 112 (2002)

Moll, K-P.; Herrmann, W.; Stößer, R.; Borchert, H.-H.: On the molecular dynamics of selected spin labels in liposomal preparations applied to human skin as investigated using X-band ESR tomography: 2. Penetration studies, Arch. Pharm. **335**, 116 (2002)

Vortrag

Moll, K-P.; Mäder, K.; Herrmann, W.; Kroll, C.; Müller, R. H.; Borchert, H.-H.: Spectral spatial imaging and penetration of liposomes into human skin, International Workshop on Thechniques and Bio-Medical Applications of In Vivo EPR and PEDRI, September 1999, Aberdeen, U.K.

Poster

Moll, K-P.; Mäder, K.; Herrmann, W.; Kroll, C.; Müller, R. H.; Borchert, H.-H.: Spectral spatial imaging and penetration of liposomes into human skin, International Workshop on

Techniques and Bio-Medical Applications of In Vivo EPR and PEDRI, Aberdeen, U.K. (1999)

Moll, K-P.; Mäder, K.; Herrmann, W.; Müller, R. H.; Borchert, H.-H.: EPRI – A Method for studying Drug delivery into the human skin noninvasively, 3rd World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics, Pharmaceutical Technology, Berlin (2000)

Moll, K-P.; Borchert, H.-H.; Mäder, K.: EPR Investigations on Biodegradable Nano- and Microparticles, World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics, Pharmaceutical Technology, Berlin (2000)

Moll, K-P.; Borchert, H.-H.; Utsumi, H.: Non-invasive investigations on the *in vivo* behaviour of liposomal and free CAT-1 in living hairless mice using L-Band-ESR spectroscopy, International symposium on *in vivo* ESR spectroscopy, Fukuoka, Japan (2000)

Moll, K-P.; Borchert, H.-H.: ESR spektroskopische Untersuchungen zur subkutanen Injektion von multilamellaren Liposomen, Tagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft e.V., Der wissenschaftliche Nachwuchs stellt sich vor, Berlin (2001)

Moll, K-P.; Borchert, H.-H.; Utsumi, H.: Investigations on multilamellar liposomes after subcutaneous injection in mice by ESR-spectroscopy, Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft e.V., Halle (2001)

Herrmann, W.; Moll, K-P.; Stößer, R.; Borchert, H.-H.: On the molecular dynamics of selected spin labels in liposomal preparations applied to human skin as investigated using X-band ESR tomography: 1. Model systems, Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft e.V., Berlin (2002)

Moll, K-P.; Herrmann, W.; Stößer, R.; Borchert, H.-H.: On the molecular dynamics of selected spin labels in liposomal preparations applied to human skin as investigated using X-band ESR tomography: 2. Penetration studies, Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft e.V., Berlin (2002)

Hochkirch, U.; Herrmann, W.; Stößer, R.; Moll, K-P.; Linscheid, M.; Borchert, H.-H.: On the determination of spin concentrations in EPR tomography for the examination of penetration and permeation process on human skin, Analytika, Konstanz (2003)

Erklärung

Ich versichere, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe.

Berlin, den

Klaus-Peter Moll